



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

NUEVOS FOTOSENSIBILIZANTES EN EL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO DEL CÁNCER

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bioquímica

Pablo Daniel Vallecorsa

Director/a de Tesis: Dra. Adriana Casas
Codirector/a de tesis: Dra. Gabriela Di Venosa

Consejero de estudios: Dra. Silvia Hajos

Lugar de trabajo: **Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias**. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

Buenos Aires, 2018



NUEVOS FOTSENSIBILIZANTES EN EL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO DEL CÁNCER

Resumen

La terapia fotodinámica (TFD) se basa en la utilización de ciertos compuestos químicos (fotosensibilizantes, FS) que tienen la capacidad de activarse y generar citotoxicidad al ser expuestos a la luz. Al ser irradiados con luz de longitud de onda adecuada, disparan un efecto tóxico en la célula, mediado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir del oxígeno presente en los tejidos. El principal daño que ocasiona la TFD es la pérdida de función de biomoléculas por oxidación de las mismas, dañando además la microvasculatura tumoral y activando el sistema inmune. La ventaja que presenta por sobre otras terapias es su selectividad por acumulación del FS en el tejido tumoral, dada la vasculatura caótica y los mecanismos ineficientes de eliminación. A su vez, la irradiación dirigida únicamente sobre el tejido blanco, le aporta una seguridad mayor y define su aplicación, siendo ésta sobre tejidos expuestos y de fácil acceso por vía endoscópica; actuando así como agente terapéutico (TFD) o en la fotodetección (FD), a partir de FS fluorescentes. Otra ventaja es que puede usarse combinada con otras modalidades terapéuticas. Los FS más utilizados son las porfirinas, ya que poseen las características buscadas en un FS ideal, tales como alta absorptividad, elevada producción de $^1\text{O}_2$, y buen rendimiento cuántico de fluorescencia, aunque poseen la desventaja de la prolongada fotosensibilización cutánea que provocan debido a su lenta depuración.

La utilización de pro-FS permite la síntesis endógena de FS, como es el caso del ácido 5- aminolevulínico (ALA), que aprovecha las alteraciones en la vía metabólica del hemo, presentes en muchos tumores y afecciones proliferativas, para acumular FS porfirínicos principalmente la Protoporfirina IX.

En la búsqueda de mejorar la TFD se plantea el diseño de nuevos FS o la modificación de pro-FS (principalmente derivados del ALA).

Los FS derivados de porfirinas meso aril sustituidos son interesantes al ser fáciles de generar con buenos rendimientos, y sobre todo resultan atractivas por ser fácilmente sustituidas en el grupo fenilo para modificar la lipofiliidad de la molécula. La utilización de grupos cargados positivamente se reportó en varias ocasiones como promisorio para la interacción con las membranas biológicas.

En relación a los pro-FS, con la introducción de grupos lipofílicos a la estructura molecular del ALA, se pretende mejorar sus propiedades físicas, a fin de lograr una mejor penetración a través de membranas biológicas, una mejor biodistribución y selectividad por el tumor.

En esta tesis se llevaron a cabo diferentes estrategias para la mejora en la TFD, a partir de la síntesis de nuevos FS basados en porfirinas, y pro-FS basados en ALA. Se sintetizaron 5 nuevos FS meso tetrafenilporfírinicos con diferentes sustituyentes y configuraciones alrededor del macrociclo. Por otra parte, se sintetizaron diferentes derivados de ALA a partir de la conjugación del ALA con diferentes sustituyentes ésteres, aminoácidos y vehículos moleculares como los dendrímeros. A su vez, se intentó encontrar la aplicación óptima para cada uno de ellos, razón por la cual fueron evaluados en diferentes modelos *in vitro* y eventualmente *in vivo*, de acuerdo a sus características químicas.

Para este propósito se emplearon varias líneas celulares, tales como la adherente de carcinoma mamario murino LM3, los queratinocitos normales Pam212 y los tumorales transfectados Pam212-Ras, las líneas no adherentes de linfoma cutáneo de células T Myla y Hut78, las endoteliales HMEC-1 y los macrófagos RAW 264.7, siendo estas dos últimas empleadas por ser componentes principales de las placas ateromatosas. Con el fin de poder trasladar los resultados obtenidos *in vitro* a *in vivo* se trabajó con el modelo de adenocarcinoma mamario murino LM3 y LM2. Este modelo de implantación subcutánea de un adenocarcinoma mamario es de fácil implementación por su bajo costo y por tratarse de un trasplante alogénico.

La porfirina TAPP fue el FS más promisorio de los evaluados, sirviendo de molde para ulteriores modificaciones en su esqueleto base. Por otro lado, los nuevos derivados ésteres han demostrado excelentes rendimientos en la síntesis de porfirinas y la TFD comparables con los del derivado comercial más exitoso a nivel clínico Hexil-ALA. La conjugación del ALA con aminoácidos ha demostrado interesantes propiedades *in vivo* para el tratamiento de patologías cutáneas. La utilización de pequeños dendrímeros conteniendo ALA en su estructura, han resultado exitosos en vehiculizar y dosificar la liberación del ALA, demostrando un particular potencial para la fotoangioplastia. Los resultados obtenidos en esta tesis sientan las bases racionales para la generación de nuevos compuestos, así como también para un reposicionamiento de la TFD en ciertas patologías, que hasta el momento no eran un blanco habitual. Estos estudios nos alientan a seguir enfocados en la mejora de la TFD, entendiéndola como un tratamiento realmente efectivo contra el cáncer, con gran potencial no sólo por sí mismo sino también como complemento a las terapias tradicionales, y a seguir extendiendo los usos de la TFD a otras patologías.

Palabras claves: Terapia fotodinámica; Cáncer; Fotosensibilizante; Porphirina; Ácido 5-aminolevúlico; Derivado de ALA

AGRADECIMIENTOS

A la Dras. Adriana Casas y Dra. Gabriela Di Venosa, por confiar en mí y por haberme brindado la oportunidad y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto de tesis doctoral.

A la Dra. Silvia Hajos, por su buena predisposición en todo momento, y excelentes consejos académicos. Una mención especial al recuerdo, amabilidad y trayectoria de la Dra. Josefina Awruch, mi primera consejera de estudios de la FFyB.

Al Dr. Roberto Meiss y a la Dra. Vanzulli, no sólo por su valioso aporte con el análisis histológico de las muestras, sino sobre todo por ser los primeros en dirigirme y confiar en mí, hablándome siempre desde la razón y el corazón.

Al Dr. Daniel Sáenz y al Lic. Gustavo Calvo por su paciencia y colaboración, y por su compañía diaria en el laboratorio.

A los directivos del Instituto CIPYP Dra. Maria Victoria Rossetti, Dra. Victoria Parera y Dra. Alcira Batlle, por abrirme las puertas de la institución, y por su interés y apoyo continuo que posibilitó la realización de este proyecto doctoral.

Al resto de mis compañeros del CIPYP que me han brindado su apoyo y compañía durante estos años.

A los grupos colaboradores del Dr. Durantini, Dr. Ramirez, Dr. Eggleston y Dra. Battah por la síntesis química de los compuestos y por sus consejos sobre el tema.

A la empresa Lumiia S.A por la provisión del láser 635 nm y por el asesoramiento técnico.

A mis padres y a mi hermano Julián, por haber alentado siempre mi progreso personal y profesional, por la contención continua y consejos desde corazón.

A Johanna y a los dos enanos, por ser mi familia, por el amor y la paciencia que siempre me brindan.

Al CONICET por la beca financiada para la realización de esta tesis, y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por aceptarme como doctorando y brindarme las posibilidades de una formación de excelente nivel.

A todas aquellas personas que a lo largo de la vida me han demostrado, a través de su ejemplo, que el esfuerzo y la dedicación constituyen el único medio posible para el progreso y la dignidad.

ABREVIATURAS

1f: (4-fluorofenilcarbamoil) metil 5-amino-4-oxopentanoato
1g: (*p*-tolilcarbamoil) metil 5-amino-4-oxopentanoato
1h: [2-(trifluorometil)fenilcarbamoil] metil 5-amino-4-oxopentanoato
1i: (4-bromo-2metilfenilcarbamoil) metil 5-amino-4-oxopentanoato
1k: (*o*-tolilcarbamoil)metil 5-amino-4-oxopentanoato
 $^1\text{O}_2$: Oxígeno singulete
6m-ALA: Dendrímero de 6 residuos de ALA
9m-ALA: Dendrímero de 9 residuos de ALA
A₂B₂: 5,15-di(4-[3-N,Ndimetilaminopropoxi]fenil)-10,20-di(4-trifluorometilfenil) porfirina
Ac-Leu-ALA-Me: metil 5-(2-acetamido-4-metilpentanamido)-4oxopentanoato
Ac-Phe-ALA-Me: metil 5-(2-acetamido-3-fenilpentanamido)-4oxopentanoato
AIRC: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
ALA: Ácido 5-aminolevulínico
ALA-D: ALA dehidrasa
ALA-TFD: Terapia Fotodinámica mediada por ALA
DL50: Dosis lumínica letal 50
DMSO: Dimetilsulfóxido
FAP: Fotoangioplastia
FD: Fotodetección (tumoral)
Fe-Quel: Ferroquelatasa
FS: Fotosensibilizante, fotosensibilizantes
He-ALA: Hexil aminolevulinato
Hp: Hematoporfirina
HpD: Derivado de la hematoporfirina
i.p.: Intraperitoneal
LCCT: Linfomas cutáneos de células T
LogD: Coeficiente de partición octanol/PBS
Me-ALA: metil aminolevulinato
MF: Micosis fungoide
m-THPC: meta tetrahidrofenil clorina (Foscan®)
MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolyl)-2,5-difeniltetrazoliobromuro
NEM: N-etilmaleimida
 Φ_F : Rendimiento cuántico de fluorescencia
 Φ_A : Rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$
PAT: Piel adyacente al tumor

PBG: Porfobilinógeno

PBG-D: PBG deaminasa

PBS: Buffer fosfato de sodio

PpIX: Protoporfirina IX

Pro-FS: Pro-fotosensibilizante

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SFB: Suero fetal bovino

SS: Síndrome de Sésary

TAPP: 5,10,15,20- tetrakis[4-(3-N,N- dimetilaminopropoxi)fenil] porfirina

TCP-C₆₀: Diada entre 5-(4-formilfenil)-10,15,20-tris

[3-(N-etilcarbazoil)] porfirina, N-metilglicina y el ácido C₆₀

TEMCC: 5,10,15,20- tetrakis[3-(N-etil-N-metilcarbazoil)] clorina

TEMCP: 5,10,15,20- tetrakis[3-(N-etil-N-metilcarbazoil)] porfirina

TFD: Terapia Fotodinámica

ϵ_{max} : Coeficiente de absorción molar (en la banda de Soret)

λ_{em} : Longitud de onda de emisión

λ_{ex} : Longitud de onda de excitación

ÍNDICE

INTRODUCCION

<u>1. Cáncer</u>	1
<u>1.1 Generalidades</u>	1
<u>1.2 Clasificación</u>	1
<u>1.3 Etiología</u>	2
<u>1.4 Causas de mutación</u>	4
<u>1.5 Un problema de salud mundial</u>	4
<u>1.6 Tratamientos</u>	6
<u>2. Terapia Fotodinámica</u>	8
<u>2.1 Generalidades</u>	8
<u>2.2 Historia de la TFD</u>	10
<u>2.3. Luz</u>	13
<u>2.4 Oxígeno y reacciones fotoquímicas</u>	18
<u>2.5 Fotosensibilizantes: generalidades</u>	20
<u>2.5.1 Porphirinas</u>	21
<u>2.5.2 Fotosensibilizantes derivados de porfirinas</u>	23
<u>2.5.3 Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores</u>	27
<u>2.6 Pro-fotosensibilizantes (pro-FS)</u>	28
<u>2.6.1 Acido 5-aminolevúlico</u>	28
<u>2.6.2 Derivados ésteres y peptídicos de ALA</u>	34
<u>2.6.3 Dendrímeros de ALA</u>	37
<u>2.7 Aplicaciones oncológicas de la TDF</u>	38
<u>2.8 Aplicaciones no oncológicas de la TDF</u>	43
<u>3. Referencias</u>	44

HIPOTESIS GENERAL Y OBJETIVOS

<u>1. Hipótesis general</u>	56
<u>2. Elaboración de la hipótesis</u>	56
<u>3. Objetivo general</u>	64
<u>4. Objetivos específicos</u>	65
<u>5. Referencias</u>	67

MATERIALES Y METODOS

<u>1. Reactivos y solventes</u>	70
<u>2. Síntesis de derivados de ALA</u>	70
<u>2.1 Derivados ésteres de ALA</u>	70
<u>2.2 Derivados conjugados de ALA</u>	70
<u>2.3 Derivados peptídicos de ALA</u>	71

<u>2.4 Síntesis de dendrímeros de ALA</u>	72
<u>2.5 Predicciones de logD</u>	73
<u>3. Síntesis de nuevos FS</u>	73
<u>4. Líneas celulares</u>	75
<u>5. Determinación del número de células</u>	76
<u>6. Exposición de células a ALA, derivados de ALA, dendrímeros y FS</u>	77
<u>7. Extracción de porfirinas intracelulares sintetizadas <i>in vitro</i> a partir de ALA, derivados de ALA o dendrímeros</u>	77
<u>8. Extracción de los nuevos FS incorporados a las células</u>	78
<u>9. Tratamiento de TFD <i>in vitro</i></u>	78
<u>10. Fuente de luz</u>	78
<u>11. Ensayo de viabilidad de MTT</u>	79
<u>12. Determinación de transporte celular de dendrímeros y FS</u>	80
<u>12.1 Mecanismos de difusión pasiva y transporte activo de TAPP</u>	80
<u>12.2 Endocitosis</u>	80
<u>12.2.1 Inhibición de fusión endosoma-lisosoma</u>	80
<u>12.2.2 Inhibidores de la endocitosis</u>	80
<u>13. Localización subcelular de TAPP</u>	81
<u>14. Animales</u>	81
<u>15. Administración de pro-FS y FS en animales</u>	82
<u>16. Espectroscopía de fluorescencia para cuantificación de porfirinas en la piel de ratón</u>	83
<u>17. Extracción de porfirinas a partir de ALA de tejidos</u>	84
<u>18. Extracción de porfirinas a partir de TAPP de tejidos</u>	84
<u>19. Distribución de porfirinas en el tumor y la piel adyacente al tumor por microscopía de fluorescencia</u>	85
<u>20. Procedimiento de Terapia Fotodinámica <i>in vivo</i></u>	86
<u>21. Estudios histológicos luego de TFD <i>in vivo</i></u>	86
<u>22. Análisis estadístico</u>	87
<u>23. Referencias</u>	87

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Estudio de nuevos FS para su uso en la Terapia Fotodinámica del cáncer	90
<u>1.1 Incorporación de porfirinas <i>in vitro</i></u>	91
<u>1.2 Terapia fotodinámica <i>in vitro</i> a partir de porfirinas sintéticas</u>	93
<u>1.3. Estudios de incorporación de TAPP a la célula</u>	95

<u>1.4 Localización subcelular e incorporación de TAPP en función del tiempo</u>	96
<u>1.5. Ensayos <i>in vivo</i>: TAPP tópico</u>	100
<u>1.6. Ensayos <i>in vivo</i>: TAPP tópico, biodistribución cutánea</u>	100
<u>1.7. Ensayos <i>in vivo</i>: TAPP sistémico y biodistribución</u>	101
<u>1.8. Discusión</u>	103
<u>1.9. Referencias</u>	109
 CAPITULO 2: Uso del ALA y derivados ésteres del ALA en células de Linfomas Cutáneos	113
<u>2.1. Síntesis de porfirinas <i>in vitro</i> a partir de ALA</u>	115
<u>2.2. Terapia fotodinámica <i>in vitro</i> a partir de ALA</u>	115
<u>2.3. Síntesis de porfirinas <i>in vitro</i> a partir de los ésteres Me-ALA y He-ALA</u>	116
<u>2.4. Terapia fotodinámica <i>in vitro</i> a partir de los ésteres Me-ALA y He-ALA</u>	117
<u>2.5. Síntesis de porfirinas <i>in vitro</i> a partir de los conjugados de ALA</u>	118
<u>2.6. Terapia fotodinámica <i>in vitro</i> a partir de los nuevos conjugados de ALA</u>	120
<u>2.7 Discusión</u>	123
<u>2.8 Referencias</u>	128
 CAPITULO 3. Estudio de dos nuevos derivados peptídicos de ALA	131
<u>3.1. Síntesis de porfirinas en cultivos <i>in vitro</i></u>	132
<u>3.2. Terapia fotodinámica <i>in vitro</i></u>	133
<u>3.3 Ensayo <i>in vivo</i> tópico: síntesis de porfirinas</u>	135
<u>3.4 Distribución de porfirinas en piel luego de la aplicación tópica de ALA y sus derivados peptídicos</u>	137
<u>3.5 Biodistribución sistémica de porfirinas</u>	138
<u>3.6 Terapia fotodinámica <i>in vivo</i></u>	140
<u>3.7 Discusión</u>	142
<u>3.8 Referencias</u>	147
 Capítulo 4: Estudio de dos nuevos dendrímeros de ALA	150
<u>4.1 Síntesis de porfirinas en cultivos <i>in vitro</i> en células LM3</u>	151
<u>4.2. Terapia Fotodinámica <i>in vitro</i></u>	153
<u>4.3. Ensayo <i>in vivo</i> tópico: síntesis de porfirinas</u>	154
<u>4.4. Síntesis de porfirinas <i>in vitro</i> en componentes celulares de</u>	156

<u>la placa ateromatosa</u>	
4.5. <u>Terapia fotodinámica en los componentes celulares</u>	159
<u>de la placa ateromatosa</u>	
4.6. <u>Comparación de síntesis de porfirinas en células</u>	160
<u>RAW 264.7 y HMEC-1 expuestas a concentraciones</u>	
<u>equimolares de ALA y dendrímeros</u>	
4.7. <u>Ensayo de captación celular e inhibición de la endocitosis</u>	161
4.8. <u>Discusión</u>	162
4.9. <u>Referencias</u>	167
 DISCUSIONES GENERALES Y CONCLUSIONES	
<u>Discusiones generales y conclusiones</u>	170
<u>Referencias</u>	178

El agua es buena, el aire es mejor y la luz es lo mejor de todo.

Arnold Rikli (1823-1906), padre de la fototerapia



INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

1.1 Generalidades

Cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades no transmisibles relacionadas, donde células propias del cuerpo sufren transformaciones que modifican los patrones normales de división, proliferación y muerte celular, quebrándose así la fina regulación y orden en los tejidos, promoviendo el crecimiento de una masa descontrolada de células malignas con capacidad de invasión y diseminación a sitios distantes.

En relación a su etimología, el término cáncer surge de la traducción al latín de la palabra griega *karkinos* (cangrejo), introducida en el siglo IV a.C. en el *Corpus Hippocraticum*, colección de obras atribuidas a Hipócrates, para la descripción de una lesión crónica e invasora o cáncer en el sentido moderno. Sin embargo, por mucho tiempo el término se mal uso confundiéndose así con otras lesiones, tales como las lesiones ulcerosas, y no fue sino hasta el siglo XVIII que se utilizara correctamente (Salaverry, 2013).

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal. El ser humano cuenta según últimas estimaciones con 37,2 billones de células (Bianconi et al., 2013). Cada célula sigue rigurosamente su programa genético-epigenético, comunicándose constantemente a partir de diversas señales, en pos del funcionamiento correcto del tejido, órgano y en definitiva, del organismo en su conjunto. Los fallos existen, pero a lo largo de la evolución se han desarrollado mecanismos específicos para subsanarlos, minimizando los riesgos acaecidos. En el cáncer, todo este proceso ordenado y riguroso se altera por completo, dando lugar a una entidad independiente, sin un objetivo concreto más que el de proliferar, llegando a producir masas celulares considerables (tumores), que alteran la funcionalidad y lógica biológica en el lugar donde se asientan.

1.2 Clasificación

La clasificación más general para los tumores es la clínica, donde se dividen en benigno y maligno. La propiedad que define fundamentalmente a los tumores malignos, y que no presentan los benignos, es que invaden otras regiones fuera de su tejido de origen y se diseminan a órganos distantes. Por ejemplo, un adenoma

tubular de colon permanece confinado al epitelio colónico. En cambio, un adenocarcinoma invade toda la pared colónica, y si no se lo controla, habrá de propagarse a todos los órganos (Newell, Meiss y Finlayson, 2012).

Una clasificación más específica para distinguirlos, es en base a la función del tejido y células de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos (Newell, Meiss y Finlayson, 2012):

- i) Los sarcomas procedentes del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- ii) Los carcinomas originales de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y próstata. Estos incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas, en tanto que, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.
- iii) En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. A diferencia del resto de los tumores, no forman masas sólidas de tejido.

1.3 Etiología

La etiología del cáncer no se conoce con certeza absoluta y conviven en la actualidad cinco paradigmas en concreto (Dosne Pasqualini, 2003):

- a) La teoría viral, surge en la primera mitad del siglo XX, a partir del descubrimiento que ciertos virus serían, sobre todo en animales, causantes de sarcomas o leucemias, denominándose como oncovirus, ejemplo de ello son el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus del tumor mamario murino (MMTV), entre otros. También fue posible determinar en humanos la existencia de oncovirus como el virus del papiloma humano, el virus Epstein-Barr y el virus de la hepatitis B y C. Sin embargo, se vio que los oncovirus no eran siempre exógenos ya que podían ser inducidos por radiación ionizante.

b) La teoría del oncogén, se origina siguiendo la línea de descubrimientos y paralelamente al hallazgo de los retrovirus y los transposones o genes saltarines. Paulatinamente se fueron encontrando copias celulares (c-onc) de todos los oncovirus (v-onc) previamente descriptos, pasándose a denominar oncogenes o genes promotores de tumores. Estos tienen un efecto positivo o estimulador de la proliferación neoplásica, sin embargo, muchos de ellos desempeñan importantes funciones en la célula normal por lo que se los denomina protooncogenes. Estos genes desempeñan funciones variadas, como por ejemplo, participación en el ciclo celular, señalización, factores de crecimiento, entre otros. Es así, que se postula que mutaciones de ganancia de función dominantes transforman estos protooncogenes en oncogenes.

c) A partir del hallazgo de genes que estando ausentes o inactivados de forma recesiva promueven la formación de tumores, es que surge la teoría del anti-oncogen o gen supresor de tumores (como el p53, Rb y el APC). Estos genes actúan en su mayoría en detectar y reparar el daño al ADN, o para eliminar la célula en caso de fracasar la reparación. La delección de estos genes deja a la célula vulnerable a la aparición de mutaciones transformantes.

d) La teoría génica, trata de englobar tanto la teoría oncogénica como la de genes supresores de tumores. Considera que un cáncer surge como consecuencia de una cascada de eventos en el ADN genómico que involucra tanto la activación de oncogenes como delección de genes supresores de tumor lo que, por ejemplo, convertiría paso a paso a un pólipo en adenoma colorrectal y luego en un carcinoma, y así hasta la aparición de metástasis.

e) Por último, y más actual, la teoría de la inflamación o del microambiente, contempla la confluencia de eventos inflamatorios crónicos, el escape al sistema inmunológico y a las alteraciones epigenéticas como factores importantes en el asentamiento del cáncer.

Muy recientemente han aparecido dos teorías innovadoras que se complementan mutuamente. La primera, concibe al origen del cáncer como un intento desesperado del tejido por reparar una injuria que no sana, donde las adaptaciones adquiridas por el tumor responden a una falta de respuesta a la señal de regeneración (Bustuoabad y Ruggiero, 2006). La segunda propone que la carcinogénesis progresa desde lesiones benignas premalignas a partir de la formación de antígenos específicos tumorales que inducen una respuesta inmunológica estimulante del crecimiento tumoral (Prehn y Prehn, 2013)

Respecto a la célula blanco a partir de la cual se origina la estirpe tumoral existen dos teorías principales: la primera sugiere que los tumores constan de células diferenciadas que a partir de mutaciones se desdiferencian ganando libertad de acción. La segunda teoría, más reciente, postula que las células madre tisulares al adquirir mutaciones serían el foco inicial del tumor con diferente grado de diferenciación, y también serían capaces de producir una población menor de células autorenovables, encargada de mantener el tumor ante los ataques del sistema inmune y los fármacos antitumorales (Newell, Meiss y Finlayson, 2012).

1.4 Causas de mutación

Ciertos factores son capaces de originar una transformación maligna en un porcentaje de individuos expuestos a ellos (Newell, Meiss y Finlayson, 2012). Entre estos se encuentran:

1. Radiación ionizante: rayos X, gamma, ultravioleta.
2. Radicales libres, a partir de la exposición a radiación y toxinas ambientales.
3. Ciertos fármacos: sobre todo quimioterápicos como la ciclofosfamida, la doxorubicina y el metotrexato.
4. Sustancias químicas: como los asbestos, oxidantes, sales de metales pesados.
5. Algunos virus que reprograman el núcleo celular: como el virus de la hepatitis B y C, de Epstein-Barr, y del papiloma humano.
6. Mutaciones hereditarias del ciclo celular, del factor de crecimiento, y de proteínas reparadoras de ADN.

1.5 Un problema de salud mundial

El cáncer afecta a millones de personas en todo el mundo y constituye la segunda causa de fallecimientos, después de las enfermedades cardiovasculares. Sólo en el 2015, se registraron 15 millones de nuevos casos; 8,8 millones de defunciones y 33 millones de personas diagnosticadas con cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Los cinco tipos de cáncer que causan el mayor número de fallecimientos según estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (AIRC) son:

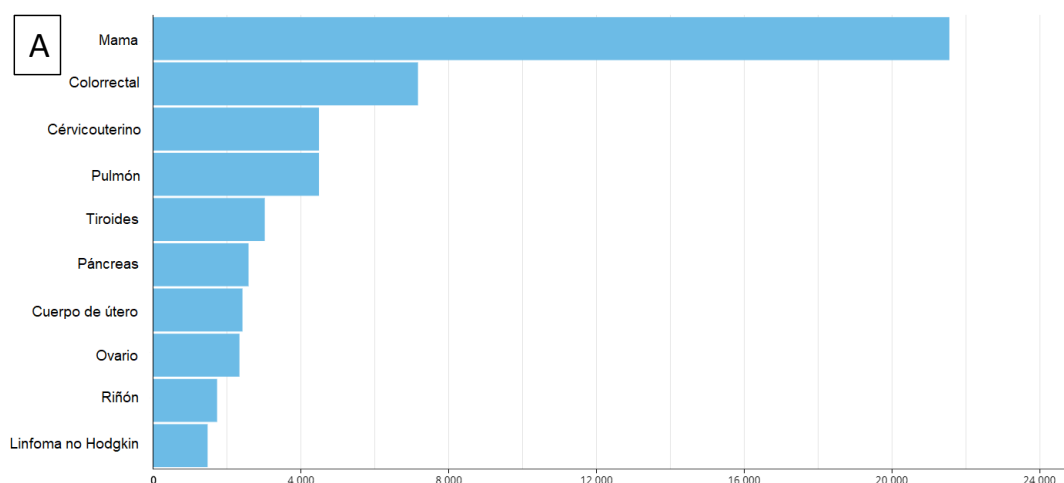
- a. Pulmonar (1,8 millones de defunciones).
- b. Colorrectal (880 mil defunciones).
- c. Gástrico (782 mil defunciones).
- d. Hepático (781 mil defunciones).
- e. Mamario (626 mil defunciones).

La ocurrencia y el estado actual del cáncer en la Argentina tiene seguimiento a partir del Sistema de Vigilancia del Cáncer (SIVER-Ca) dependiente de la Secretaría de Salud en trabajo mancomunado con el Registro Institucional de Tumores de Argentina (RITA) y los Registros de Cáncer de base Poblacionales (RCBP) del país.

La Argentina posee una tasa de incidencia de 218 casos por 100.000 habitantes, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres; cifra que la posiciona dentro de los países con incidencia de cáncer media-alta (rango 172,3 a 242,9 por 100.000 habitantes), ubicándola a su vez en el séptimo lugar en la región de las Américas según datos de la IARC (Figura 1).

En el país, el cáncer de mama es el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia: con un volumen de más de 19 mil casos al año, representa el 17% de todos los tumores malignos y casi un tercio de los cánceres femeninos. El cáncer colorrectal en ambos sexos registra aproximadamente 14 mil casos nuevos por año, concentrando el 12% del total de tumores.

En los hombres, la mayor incidencia está dada por el cáncer de próstata, con una ocurrencia de más de 11 mil casos anuales, que representan el 20% de todos los tumores malignos en el género y 10% de la totalidad de cánceres registrados en el país.



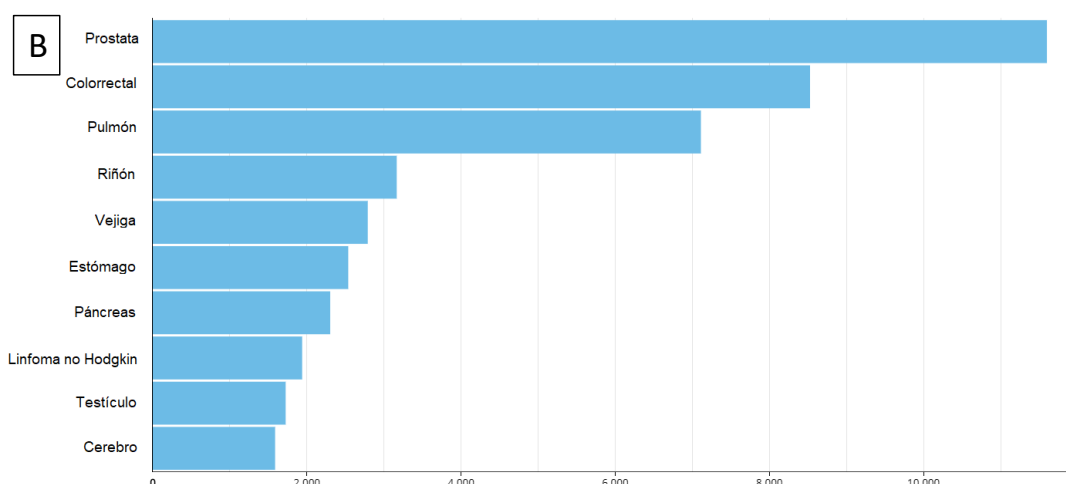


Figura 1. Comparación de incidencia del cáncer en Argentina. Estimaciones de la IARC para Argentina 2018. A. Mujer; B. Hombre

1.6 Tratamientos

Los programas sobre cáncer a nivel mundial están abocados, más allá del tratamiento, a la prevención y al correcto y pronto diagnóstico (Organización Mundial de la Salud, 2018). Una vez que se tiene el diagnóstico tumoral es posible seleccionar una o varias modalidades de tratamiento, que dependerá de la estirpe y de lo avanzado que esté el cuadro clínico. Los tratamientos convencionales implican la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La cirugía contempla la remoción de la masa tumoral y de los ganglios o tejido circundante comprometidos. Se aplica para tumores localizados, es decir, que no se han diseminado en focos secundarios o metástasis, y de un tamaño pequeño a mediano.

Al igual que la cirugía, la terapia de radiación se usa principalmente para tratar cánceres localizados. La radiación ionizante (principalmente rayos X) destruye o daña las células tumorales para impedir su crecimiento. Puede usarse por sí sola o en conjunto con la cirugía o quimioterapia. Estimaciones sugieren que más de la mitad de todas las personas con cáncer reciben tratamiento de radiación en alguna ocasión.

A diferencia de las otras modalidades, la quimioterapia puede tratar el cáncer que se ha propagado fuera del sitio de origen; utiliza la administración de fármacos sistémicos. Dependiendo del tipo de cáncer y de su etapa, la quimioterapia se puede administrar por diferentes razones: desacelerar el crecimiento tumoral, evitar la propagación, eliminar células cancerosas que se hayan propagado,

reducir el tamaño tumoral antes de la cirugía, y/o reducir el riesgo de recidivas (Intituto Nacional del Cáncer, 2017).

Otro tipo de terapias vigentes que utilizan fármacos son las denominadas terapias biológicas, que administran elementos complejos derivados de fuentes vivas, tanto humana, animal o a partir de microorganismos. Su producción se basa en el conocimiento ya sea del blanco celular específico a atacar, de los mecanismos de crecimiento y sobrevida, o de las interacciones con el estroma y el sistema inmunológico. Algunas terapias biológicas utilizan la estrategia de estimular el propio sistema inmunitario del huésped para que actúe contra las células cancerosas, ejemplo de ello son las terapias basadas en anticuerpos, también llamada "inmunoterapia". Las terapias que interfieren con moléculas específicas tumorales se denominan también terapias dirigidas. El uso de las terapias biológicas genera inquietud, debido al desconocimiento sobre los efectos a largo plazo del bloqueo o inhibición persistente de elementos regulatorios y vitales, como son las citocinas o sus receptores (TNF, IL-1, IL-6R) o las células del sistema inmune (linfocitos B y C) (Lozano, 2011, Alonso Castellanos et al., 2014).

A pesar de la diversidad de metodologías, el factor determinante a la hora de combatir el cáncer es la prevención y el diagnóstico temprano, que aumentan el éxito terapéutico por sobre el 90%. Las terapias farmacológicas y de radiación ionizante tienen a menudo efectos secundarios importantes, como problemas digestivos, pérdidas de peso, alteración en la función renal, entre otros; lo que dificulta aún más la sobrevida de los pacientes oncológicos (Montero et al., 2005). Estas problemáticas se deben en gran medida a la falta de selectividad o especificidad del blanco terapéutico, es decir, que atacan tanto a células tumorales como a células sanas del cuerpo. Otro problema que surge es la resistencia que adquiere el tumor a las terapias, que lo vuelve refractario. Ante este cuadro, es que han surgido nuevas terapias para tratar el cáncer, diseñadas para complementar a las terapias convencionales, ya sea reduciendo las dosis que estas utilizan o atacando blancos donde éstas no puedan actuar (Doroshov, 2016).

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento que combina el uso de radiación no ionizante con la administración de un fármaco fotoactivable con selectividad por las células tumorales.

2. Terapia Fotodinámica

2.1 Generalidades

La TFD es un tratamiento para el cáncer y otras patologías, como enfermedades de la piel, ginecológicas e infecciosas (Fotoinactivación bacteriana), entre otras. También se utiliza en la industria cosmética, para reducir los signos de envejecimiento y el acné.

La terapia se basa en la utilización de ciertos compuestos químicos que tienen la capacidad de activarse y generar citotoxicidad al ser expuestos a la luz. Estos compuestos se conocen como agentes fotosensibilizantes (FS). Al ser irradiados con luz de longitud de onda adecuada para su activación, disparan un efecto tóxico en la célula, cuyo primer paso es la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir del oxígeno presente en los tejidos (Figura 2). El principal daño que ocasiona la TFD es la pérdida de función de biomoléculas por oxidación de las mismas, ejemplo de este tipo de daño es la peroxidación lipídica y la disrupción de las membranas (Kennedy et al., 2003; Sakharov et al., 2003). La magnitud del daño producido depende de los siguientes factores: el FS, la luz y el daño oxidativo. La muerte celular por TFD no parece depender de la fase del ciclo celular o de factores genéticos (Socoteanu et al., 2011).

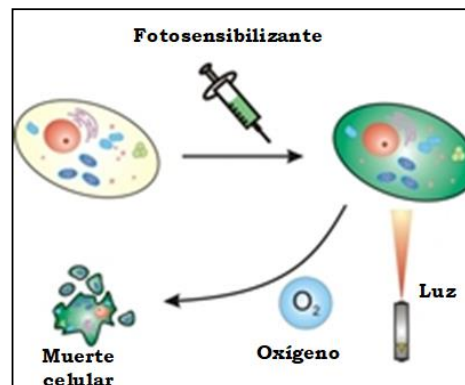


Figura 2. Esquema de la Terapia Fotodinámica

El uso de la TFD como tratamiento involucra los siguientes pasos (Figura 3):

1. Administración del fármaco (por vía tópica, oral o sistémica).
2. Acumulación selectiva del FS en el tejido tumoral.
3. Irradiación con una fuente lumínica en la zona tumoral.
4. Remisión del tejido tumoral.

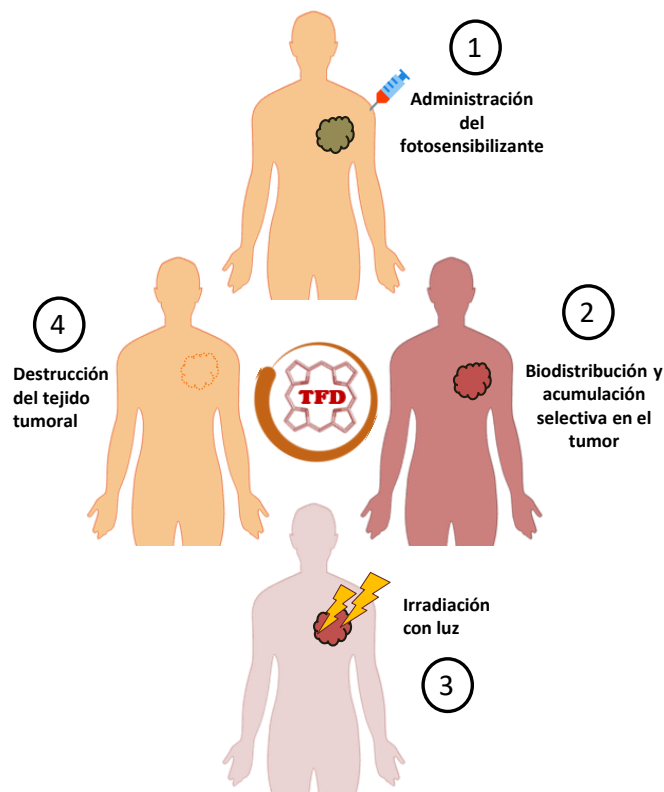


Figura 3. Principios básicos de la Terapia Fotodinámica.

La selectividad de la TFD se basa en la acumulación preferencial del FS en el tejido maligno luego de su administración. Esto puede deberse a un proceso multifactorial, siendo uno de ellos la caótica vasculatura tumoral, que puede promover un mayor influjo del fármaco, o mecanismos de eliminación más ineficientes que en el tejido sano. Además de eliminar las células cancerosas directamente, la TFD reduce o destruye los tumores de dos maneras: a) al dañar la microvasculatura tumoral, privándolos de este modo de los nutrientes necesarios, b) al activar el sistema inmunitario en la defensa contra el tumor (Senge et. al, 2013; Dabrowski et al., 2015).

Sumado a la selectividad del FS, dado que la irradiación es dirigida solamente a una zona blanco en particular, el tejido no iluminado no es afectado. Esto dota a la TFD de una seguridad que otros tratamientos no gozan. Sin embargo, esta característica también limita los sitios dónde puede llegar la luz, y por ende las zonas factibles de aplicar el tratamiento, siendo estas cualquier superficie y zona de fácil acceso con una sonda endoscópica.

La TFD presenta la ventaja de que puede usarse combinada con otras modalidades terapéuticas y que el daño celular queda restringido a la zona tumoral, con la consiguiente disminución de los efectos secundarios sobre otros órganos.

Otra gran ventaja terapéutica respecto a las demás modalidades antitumorales, es que puede ser empleada luego de otros tratamientos, por no exhibir resistencia cruzada con otras drogas; y que puede repetirse varias veces en el mismo sitio, si es necesario. Además, el riesgo de generación de nuevas neoplasias es bajo, ya que el daño al ADN es limitado, así como lo es también el riesgo de perforar o reducir la fuerza mecánica de órganos internos (Kennedy et al., 2006).

Otra ventaja de la TFD, no menos valiosa, es que varios tipos de FS como las porfirinas, las clorinas y las ftalocianinas, son capaces de fluorescer, con lo cual surge la fotodetección (FD) como una herramienta interesante para la detección y seguimiento de tumores por fluorescencia (Ackroyd et al., 2001).

2.2 Historia de la TFD

El primer uso de la luz como agente terapéutico ocurrió hace varios siglos. La luz fue utilizada por los pueblos egipcios, chinos e indios en el tratamiento de muchas enfermedades como el vitíligo, raquitismo, cáncer de piel e incluso la psicosis. Uno de los primeros reportes de la aplicación de la luz solar o helioterapia se remontan hace 3.000 años en la Grecia antigua. Con el paso de los siglos y los cambios político-religiosos se fue olvidando este conocimiento. Tuvieron que pasar milenios hasta que a fines del siglo XIX, el físico danés Niels Finsen desarrollara la fototerapia como una ciencia, y la popularizara a partir de experimentos con microorganismos. A partir de estas investigaciones se utiliza la luz UV para el tratamiento del lupus vulgaris con luz UV, y la luz roja para atenuar los efectos cutáneos de la varicela (datos históricos obtenidos de Daniell y Hill, 1991).

La fotoquimioterapia o el uso de un agente exógeno sensible a la luz con efectos terapéuticos tiene también larga data. Los psoralenos, obtenidos de semillas de *Psoralea corylifolia*, fueron usados en India en el 1400 a.C. para tratamientos del vitíligo. Los egipcios, siete siglos antes que Kalbrunner aislara el 5-metoxipsoraleno del aceite de bergamota, ya usaban extractos de la *Anmi majus* para el tratamiento del leucoderma. Recién avanzado el siglo XX, en 1974, fue que se desarrolló la terapia con PUVA donde se administra un psoraleno y se irradia con luz UV para el tratamiento de la psoriasis, el vitíligo y los linfomas cutáneos de células T (datos históricos obtenidos de Daniell y Hill, 1991).

A principios del siglo XX, Oscar Raab, un médico del grupo del Dr. von Tappeiner en Munich, fue el primero en analizar la reacción de fotosensibilización con luz visible. Pudo determinar el motivo por el cual la acridina, heterociclo del nitrógeno, era sólo efectivo contra el protista de la malaria *in vitro* pero no así *in vivo*. Raab identificó el incremento de la toxicidad del compuesto con la luz, y teorizó que el efecto deletéreo de la acridina no era por la luz en sí misma, sino un producto de la activación con ella (Raab et al., 1900). Más tarde el grupo de von Tappeiner reportó el uso de la eosina como un FS en el tratamiento del cáncer de piel, el lupus y el condiloma genital. Un año antes, se había reportado que la presencia de oxígeno era requerida para la fotosensibilización. Todos estos experimentos fueron en 1907 agrupados en una gran publicación bajo el nombre de “Terapia Fotodinámica” (TFD) (Tappeiner y Jodlbauer, 1907).

Hausman estudió las propiedades biológicas de un producto extraído con alcohol y ácido sulfúrico a partir de la hemoglobina, luego denominado hematoporfirina (Hp), siendo una mezcla cruda de varias porfirinas. En 1911, reportó la fotosensibilización de la Hp en roedores (Hausman, 1911).

Meyer-Betz (1913) realizó varias determinaciones del efecto de la estructura de la porfirina en su actividad fotodinámica. Entre 1915 y 1945 se realizaron importantes contribuciones a la química de las porfirinas, demostrando entre otras cosas que, las porfirinas naturales excretadas (uroporfirina y coproporfirina) tenían una estructura diferente a la Hp. Policard en 1924 fue el primero en describir la localización selectiva de las porfirinas en los tumores al exponer el tejido tumoral a una lámpara de Wood, que emite en los 420 nm donde absorbe el macrociclo de las porfirinas. Auler y Banzer (1942) observaron a partir de la fluorescencia que los tumores que captaban las porfirinas tendían a ser en general más necróticos ante la acción de la luz, por lo que por primera vez observaron la acción fotodinámica de la Hp sobre los tumores. Los experimentos comenzaron en humanos con tumores, pero la investigación fue interrumpida por la Segunda Guerra Mundial. Pasaron más de 20 años antes de que se retomara la investigación.

Schwartz en 1955, aisló a partir de la Hp, utilizando bases y ácidos, un componente con gran actividad, denominándose derivado de Hp o HpD (Schultz y Schwartz, 1956). Este nuevo aislamiento, demostró tener mejores propiedades fotosensibilizantes que la Hp.

Recién en 1975, Dougherty et al. fueron los primeros en demostrar una cura eficaz a largo plazo en ratones portando tumores al tratarlos con HpD y una lámpara de

arco de xenón. En 1978, el mismo grupo comenzó con los primeros ensayos sistemáticos en humanos, con pacientes con lesiones malignas cutáneas o subcutáneas, encontrando excelentes resultados. Más tarde, se llegaría a un aislamiento más puro de la HpD denominado Photofrin®. Se determinó que se trata de un porfímero, es decir, una mezcla de oligómeros formados por enlaces éter de hasta 8 unidades de porfirina (Figura 4). Este compuesto se comenzó a administrar en pacientes, pasando los ensayos clínicos y aprobándose primero en 1993 para el cáncer de vejiga, y en 1995 y 1998 para el cáncer de esofaríngeo y de pulmón, respectivamente (Administración de Alimentos y Medicamentos, FDA EEUU, revisado al 2017).

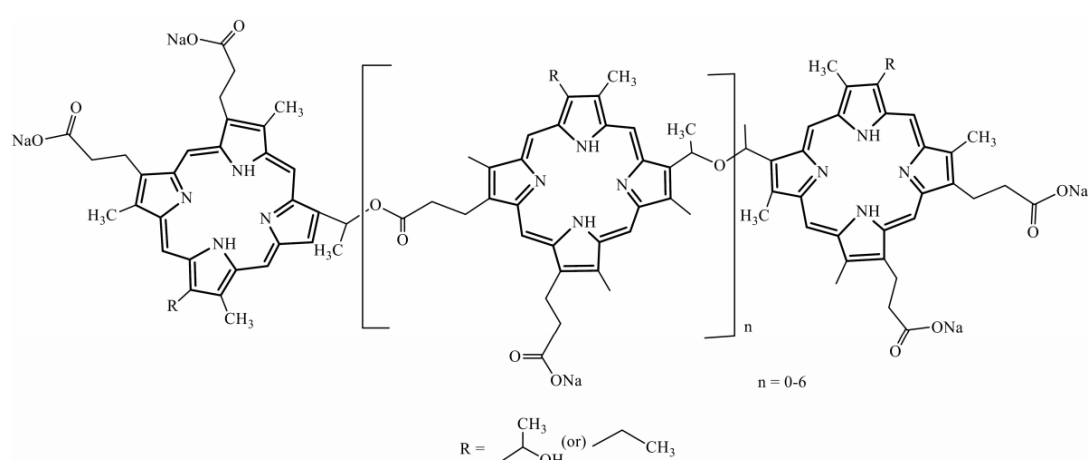


Figura 4. Estructura del porfímero sódico o Photofrin®.

A partir de entonces, es que existe un interés creciente en esta metodología terapéutica (Figura 5), con una gran cantidad de estudios experimentales y clínicos en distintos tipos de tumores con localizaciones diversas. A la vez, con el fin de optimizar la terapia, minimizar los efectos secundarios, y aumentar los blancos terapéuticos es que floreció la búsqueda de nuevos FS y pro-FS. Ejemplos de esta intención son el meta tetrafenil clorina (m-THPC) y el pro-FS ácido 5-aminolevúlico (ALA), que se tratarán en detalle en las próximas secciones.

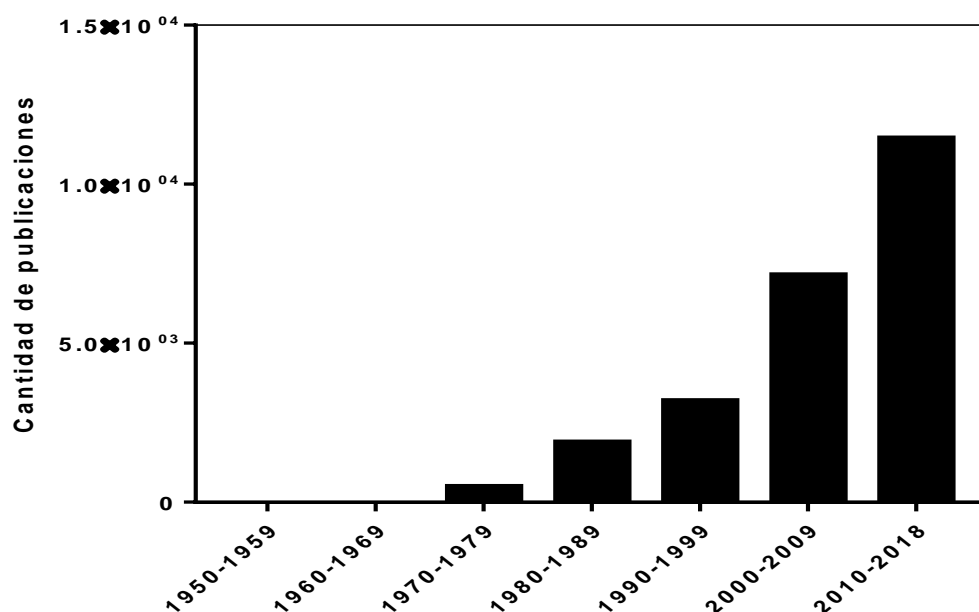


Figura 5. Crecimiento de las publicaciones en Terapia Fotodinámica (fuente PubMed, Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de EE.UU, 2018).

2.3. Luz

En TFD, la luz es el componente que actúa sobre el FS y lo activa. La luz es energía radiante, no tiene masa y viaja en el vacío al límite máximo de velocidad concebido por la ciencia humana. Tiene un componente eléctrico y uno magnético, por tanto, es correcto definirla como radiación electromagnética. El espectro electromagnético (EEM) es simplemente una forma de ordenar esta energía según ciertos parámetros, como longitud de onda o frecuencia. El EEM abarca desde los altamente energéticos rayos gamma, hasta las ondas de radio y tv de baja energía (Figura 6).

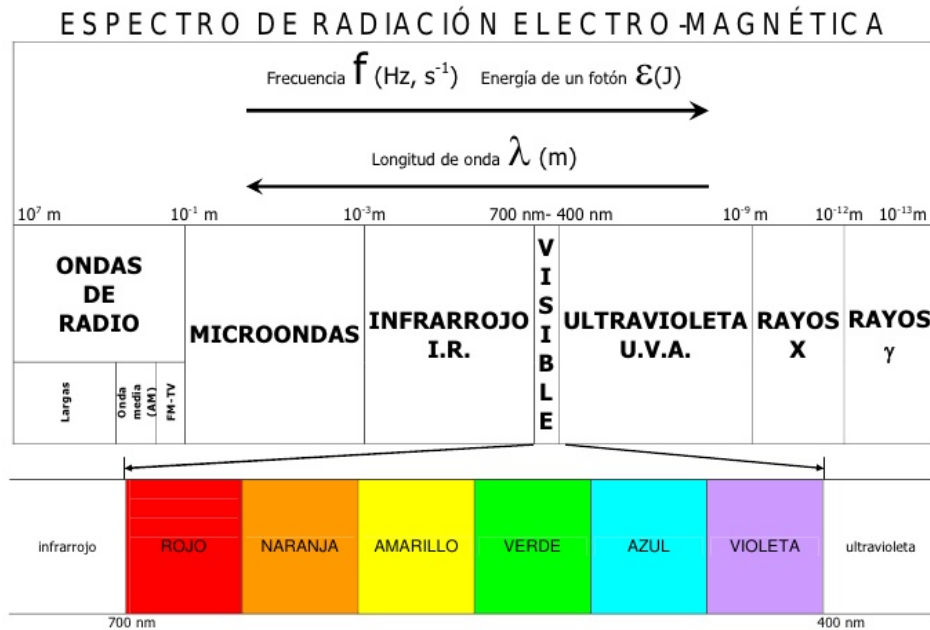


Figura 6. Espectro de radiación electromagnética.

El ojo humano discrimina una pequeña porción del EMM, el denominado espectro visible, que comprende el rango de longitudes de onda de 400 a 700 nm, dando la sensación de color. Los azules y violetas corresponden a longitudes de onda cortas, el rojo y el naranja corresponden a longitud de ondas largas, y en el medio encontramos el verde y el amarillo.

Los rayos ultravioletas (UV) y los infrarrojos (IR) no son detectados visualmente, pero pueden serlo fisiológicamente. Si son suficientemente intensos provocan una sensación de calor o una cierta coloración de la piel (bronceado). Puede considerarse que la radiación ultravioleta va desde los 350 nm hasta los 10 nm. Los rayos IR, que incluyen la energía calorífica radiante, abarcan las longitudes de onda situadas aproximadamente entre 750 nm y 1 mm. La radiación solar que llega a la tierra cubre un espectro de ondas electromagnéticas con longitudes de onda que van desde los 290 nm a los 1700 nm. Radiaciones electromagnéticas de menor longitud de onda son absorbidas por la capa de ozono y las mayores son modificadas y absorbidas por el dióxido de carbono y el vapor de agua.

Las características de la luz derivan de su entidad portadora, el fotón, que presenta tanto propiedades corpusculares como ondulatorias. Se comporta como una onda en algunos fenómenos como la refracción que tiene lugar en una lente; o como una partícula cuando interacciona con la materia para transferir una cantidad fija de energía.

Cada fuente de luz tiene un perfil espectral que la representa, que grafica la cantidad porcentual de emisión lumínica que brinda esa fuente de luz para cada longitud de onda (Figura 7).

Pueden diferenciarse distintos perfiles de espectros (Sirlin, 2006):

- a) Espectros continuos, como el que se obtiene al descomponer la luz solar y el de las emisiones lumínicas producidas por cuerpos sólidos (incandescencia).
- b) Espectros de líneas, como el que se obtiene de lámparas con emisiones lumínicas producidas a través de descarga de gases o cuerpos gaseosos en general.

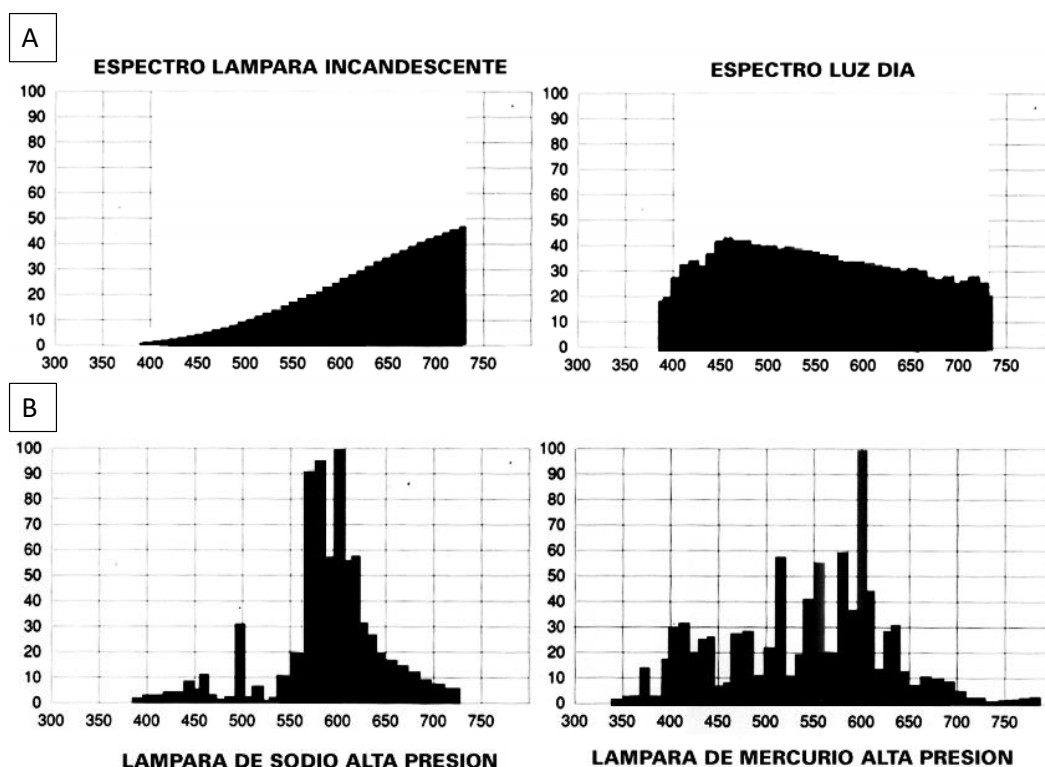


Figura 7. Espectros de emisión de diferentes fuentes lumínicas. A. Espectros continuos; B. espectros de líneas (Sirlin, 2006)

Cuando la luz interactúa con la piel hay cuatro posibles interacciones: reflexión, esparcimiento, absorción y transmisión. Los procesos que realmente ocurran dependerán de la intensidad y longitud de onda de la fuente lumínica, así como de los componentes en la piel. Dependiendo de la concentración de algunos componentes biológicos como la hemoglobina y la melanina, las propiedades de la piel se verán modificadas o tendrán coeficientes variables de refracción (n), esparcimiento (μ_b) y absorción (μ_a) (Figura 8) (Sirlin, 2006).

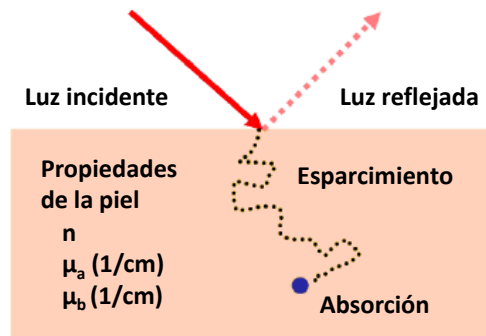


Figura 8. Interacción de la luz con la piel. Fenómenos de reflexión, esparcimiento y absorción.

En la propagación óptica en materiales biológicos, domina el esparcimiento sobre la reflexión, debido a que las estructuras celulares de las que están compuestos los tejidos no son homogéneas, además las organelas y otras estructuras celulares tienen un tamaño comparable al de la longitud de onda utilizada (Soto Thompson, 2004).

Cuando la luz entra en contacto con la materia, algunos fotones logran penetrar el tejido. Aquéllos que no fueron reflejados en la capa superficial, interactúan con los electrones en las capas exteriores de las moléculas que conforman a las células. De esta interacción el fotón puede ser absorbido o esparcido (Soto Thompson, 2004).

Al conocer la interacción de la luz con la piel en función de la longitud de onda se puede ver una ventana óptica entre los 530 y 1300 nm en la que se sitúa la mínima absorción de los componentes biológicos de la piel (Figura 9A).

A la hora de usar la luz en TFD existen tres factores importantes a tener en cuenta: la longitud de onda, la dosis total de luz en el sitio blanco y la intensidad de la misma. La longitud de onda empleada debe ser la adecuada para poder ser absorbida por el FS deseado. No siempre coincide con su pico máximo de absorción, debido a la absorción y dispersión tisulares (Figura 9B). La dosis lumínica total es tan importante como la intensidad empleada. Si la dosis es demasiado baja, las células van a lograr reparar gran parte del daño oxidativo. Cuando se emplean dosis demasiado altas, en ciertos casos puede producirse el calentamiento de los tejidos (Kennedy, 2006).

La llamada "ventana fototerapéutica" de los FS, va desde los 600 a los 1000 nm, rango en el cual la dispersión de la luz por los tejidos es baja, y hay escasa absorción por biomoléculas endógenas tales como la hemoglobina, la melanina y el agua. Estas características permiten una mayor penetración de la luz en el tejido y por lo tanto una mayor acción terapéutica.

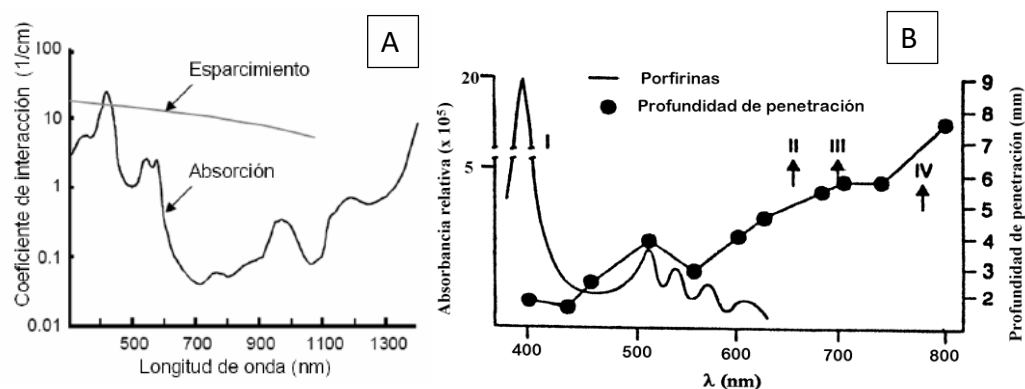


Figura 9. Ventana fototerapéutica de la TFD. (A). Esparcimiento de la luz y absorción de la piel en función de la longitud de onda. (B). Absorbancia de porfirinas y profundidad de penetración en función de la longitud de onda. Ftalocianinas y clorinas (II), ftalocianinas, purpurinas, verdinas y derivados de benzoporfirinas (III) y bacterioclorina A (IV).

Las fuentes de luz indicadas para la TFD se dividen fundamentalmente en las que emiten luz coherente y las que emiten luz no coherente. Las primeras comprenden los láseres, que llevan la luz activadora al tumor a través de fibras ópticas, y presentan la característica de emitir a una longitud de onda única. Las fuentes de luz no coherentes comprenden las lámparas y los arreglos de LEDs, que tienen la característica de emitir luz de menor potencia que las anteriores pero que poseen un espectro amplio de longitudes de onda, lo cual las hace más versátiles para su uso con diferentes FS (Figura 10).

Para el tratamiento de tumores superficiales, tales como los cutáneos o los de la cavidad oral, es suficiente con el uso de lentes y aperturas ópticas para producir una iluminación uniforme y continua. La fibra óptica es necesaria para el caso de tumores sólidos o situados más profundamente, y ésta puede ubicarse intersticialmente, directamente en el tejido tumoral mediante una aguja de biopsia y eventualmente con la ayuda de un equipo de ultrasonido.

En todos los casos, la penetración de la luz en el tejido no supera 1 cm de profundidad, lo cual especializa las aplicaciones de la terapia. Los tumores a ser tratados con TFD son preferentemente superficiales o bien situados en órganos huecos, donde el acceso con la luz activadora del proceso se hace a través del uso de fibras ópticas.

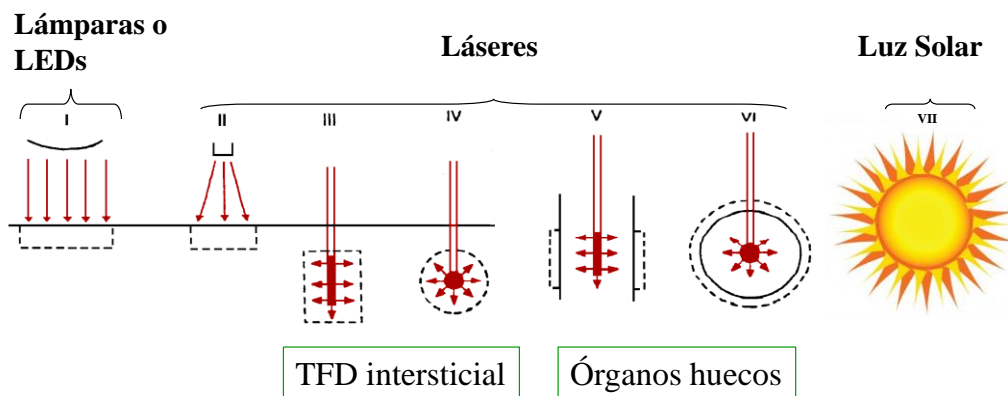


Figura I.10. Sistemas de aplicación de luz en TFD. Iluminación superficial con lámpara convencional (I), láser acoplado a una fibra óptica (II). Iluminación intersticial con un difusor cilíndrico (III) o esférico (IV). Iluminación intraluminal e intracavitaria con difusor cilíndrico (V) o esférico e isotrópico (VI). Las flechas representan la luz emitida, y la línea punteada representa la distribución de la luz en un tejido altamente refringente. (VII) Luz Solar.

2.4 Oxígeno y reacciones fotoquímicas

Una vez que el FS entra en el sitio blanco para generar su efecto fototóxico, se lo irradia con luz de longitud de onda adecuada para que este compuesto se active. La fototoxicidad de la TFD se da mayoritariamente debido a la formación de especies reactivas de oxígeno, fundamentalmente el radical oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) a partir del oxígeno disponible en los tejidos (Weishaupt et al., 1976). Esta especie es la responsable principal del daño tisular inducido por la TFD. También se observó que la presencia de secuestrantes de oxígeno singulete suprimían los efectos fototóxicos (Valenzano, 1987).

La activación del oxígeno puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: la absorción de energía suficiente como para revertir el spin de un electrón desapareado, o por reducción monovalente. Si una molécula de FS absorbe un fotón, pasa a un estado de excitación singulete de vida media extremadamente corta. Luego el FS puede volver al estado basal y emitir luz en forma de fluorescencia roja a longitudes de onda de alrededor de los 620 nm. Sin embargo para ejercer su acción fotodinámica, el FS debe pasar a un estado de excitación triplete, el cual es más estable que el estado singulete y por lo tanto tiene mayor posibilidad de interactuar con el oxígeno en estado basal (Gomer, 1989). Esta interacción permite la transferencia de energía del FS en estado triplete al oxígeno molecular generando el oxígeno singulete, el cual es altamente reactivo. Este tipo de mecanismo se denomina reacción fotoquímica tipo II.

Un camino alternativo es que la interacción se dé entre el FS y una biomolécula, con transferencia de electrones o de hidrógenos, produciendo formas radicales de ambos compuestos. Estos radicales pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular para formar especies activas como el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y anión superóxido, denominándose reacción fotoquímica tipo I (Buettner y Need, 1985; Van Steveninck et al., 1986; Athar et al., 1989) (Figura 11).

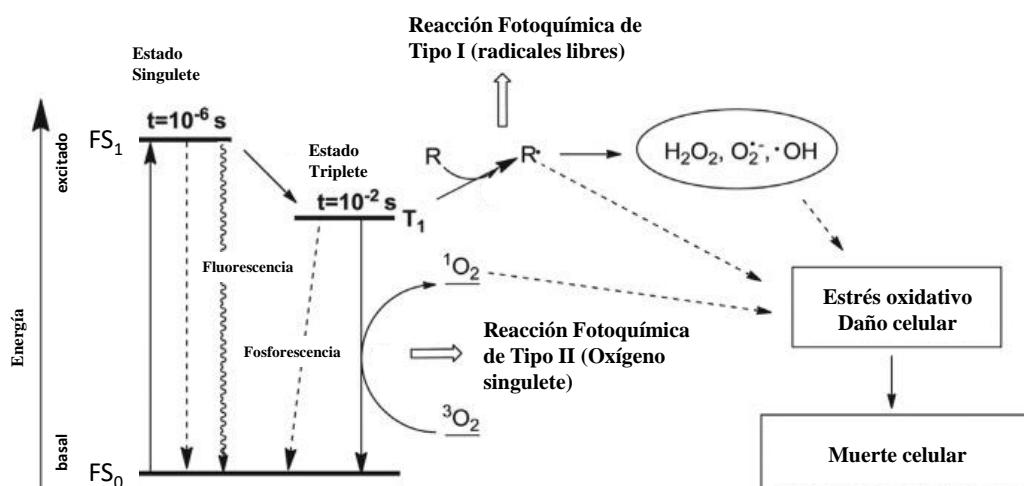


Figura 11. Diagrama de Jablonski de los procesos involucrados en TFD. Resumen de eventos fotofísicos vinculados a la TFD (Adaptado de Calzavara-Pinton, 2007).

Ante la importancia radical del $^1\text{O}_2$, la disponibilidad del oxígeno es esencial para una correcta fotosensibilización. Es fundamental una adecuada concentración de O_2 en el interior de la célula blanco inmediatamente antes de la TFD, la cual va a ir decreciendo a medida que va siendo utilizada en los procesos oxidativos. Uno de los posibles efectos de la TFD es la formación de edemas en la zona tratada, lo cual puede limitar la circulación sanguínea, y por la tanto, la reposición de O_2 . Por este motivo en la TFD se suelen utilizar dosis lumínicas más bajas durante un período de tiempo mayor, o dosis lumínicas fraccionadas para permitir la reoxigenación de los tejidos (Middelburg et al., 2010).

2.5 Fotosensibilizantes: generalidades

El FS es el fármaco que se administra para llevar a cabo la terapia, y es el eje central de la TFD vinculando el proceso de activación por luz y la reacción fotoquímica con el oxígeno presente en la célula.

Un FS ideal tiene que ser un compuesto puro, que penetre preferentemente en la célula tumoral, y además no debe ser tóxico en la oscuridad, es decir, que por sí solo no debe tener efecto citotóxico, sino solamente cuando las células son iluminadas.

Existe un gran número de FS aprobados por Organismos Internacionales de Salud y otros más en diferentes fases de investigación clínica. Principalmente se trata de estructuras orgánicas cíclicas de gran tamaño con enlaces conjugados (Figura 12), como por ejemplo las porfirinas y clorinas que derivan de un anillo tetrapirrólico con una conjugación de 18 electrones π ; otro ejemplo lo son las ftalocianinas, texafirinas y feoforbidas. Los porfircenos, colorantes y otras moléculas han sido utilizadas también como FS.

La capacidad de fluorescer de las porfirinas, clorinas y ftalocianinas, como se mencionó, resultan interesante para la FD tumoral.

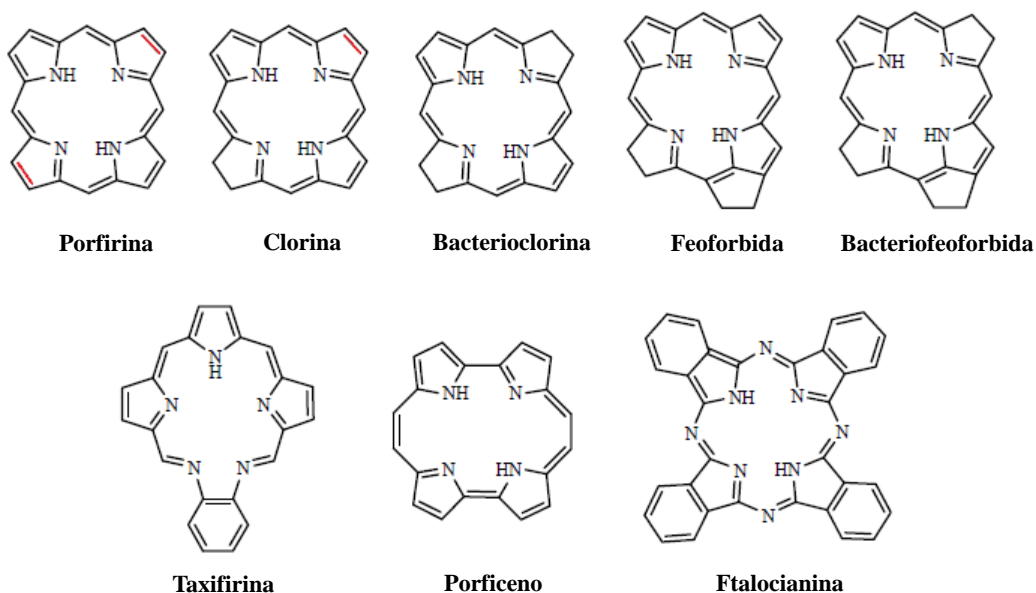


Figura 12. Estructuras moleculares de las principales familias de FS.

2.5.1 Porfirinas

Las porfirinas son de vital importancia y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, fundamentalmente por su función de grupos prostéticos en una gran variedad de hemoproteínas, tales como hemoglobina, mioglobina, catalasa, peroxidasa y los citocromos. Además en los organismos fotosintetizadores el espectro se amplía hacia las clorofilas y bacterioclorofilas, mientras que en bacterias el camino se deriva hacia la síntesis de las corrinas y la vitamina B12 (Casas, 1996).

Los tetrapirroles proveen la estructura nuclear básica de las porfirinas que consiste en un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos denominados A, B, C: y D, unidos por puentes metileno (Figura 13). La existencia de dobles enlaces conjugados en la molécula la transforma en plana, resonante y altamente resistente a las modificaciones químicas.

Esta rígida estructura planar contiene ocho cadenas laterales unidas en las posiciones β -carbono de cada anillo pirrólico, que según la nomenclatura de Fischer, son numeradas del 1 al 8 desde el anillo A. El tipo de cadena lateral determina las características físicas de la porfirina resultante. El metabolito biológicamente activo o fisiológico no lo constituye esta porfirina, sino el porfirinógeno (Figura 13), en el cual los puentes metileno se encuentran reducidos. A diferencia de las porfirinas que son coloreadas y fluorescentes, los porfirinógenos no son conjugados, son incoloros y no fluorescen, pero se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas (Princ, 1995).

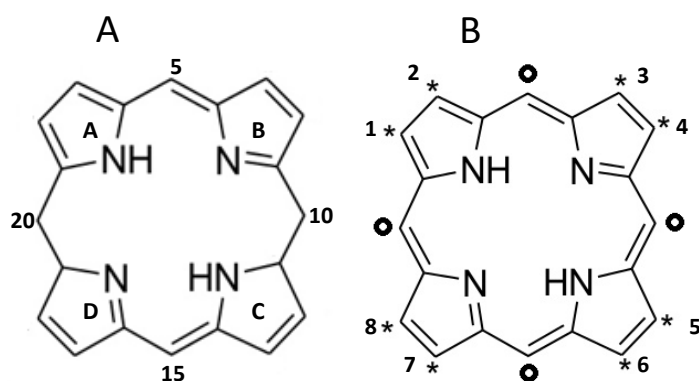


Figura 13. Estructura química de un porfirinógeno (A) y una porfirina (B). Se observa la estructura base común, donde la porfirina tiene conformados los puentes metílenos conectando los anillos B-C y A-D. En B, se muestra la comparación entre una porfirina sustituida en posición beta (asteriscos, numerados del 1 al 8) o meso (círculos posición 5, 10, 15, 20 del macrociclo).

Se emplean nombres tradicionales, ya establecidos, para las porfirinas, así como también para la designación de los isómeros de posición (Tabla 1)

Tabla 1. Estructura y nombre de las porfirinas

Nombre	Sustituyente							
Numeración de Fisher	1	2	3	4	5	6	7	8
Etioporfirina I	M	E	M	E	M	E	M	E
Etioporfirina II	M	E	E	M	M	E	E	M
Etioporfirina III	M	E	M	E	M	E	E	M
Etioporfirina IV	M	E	E	M	E	M	M	E
Uroporfirina I	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporfirina III	A	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina pentatacarboxilada III	M	P	M	P	M	P	P	A
Porfirina hexacarboxilada III	M	P	M	P	A	P	P	A
Porfirina heptacarboxilada III	M	P	A	P	A	P	P	A
Dehidroisocoproporfirina III	M	V	M	P	M	P	P	M
Coproporfirina I	M	P	M	P	M	P	M	P
Coproporfirina III	M	P	M	P	M	P	P	M
Protoporfirina IX (PpIX)	M	V	M	V	M	P	P	M
Mesoporfirina IX	M	E	M	E	M	P	P	M
Hematoporfirina IX	M	HE	M	HE	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX	M	H	M	H	M	P	P	M

M: -CH₃; E: -C₂H₅; A: -CH₂COOH, P: -CH₂CH₂COOH, V: CHCH₂; HE: -CHOHCH₃
(Adaptada de Princ, 1995)

Las porfirinas poseen espectros de absorción típicos que son de fundamental importancia para su identificación y determinación cuantitativa (Figura 14), que consisten en una banda principal e intensa en la región de 350-450 nm llamada banda de Soret, y 4 bandas de menor absorción a longitudes de onda mayores (500 - 650 nm). Las porfirinas emiten una intensa fluorescencia roja (encima de los 600 nm) cuando se excitan con luz en la banda de Soret. En solución ácida exhiben 2 fuertes bandas de emisión correspondientes a las de absorción de mayor longitud de onda.

El método espectrofluorométrico para la cuantificación de las porfirinas es muy sensible, pues permite detectar cantidades del orden de 0,01 a 10 nM. Cuando

están queladas con metales que no tienen electrones desapareados (por ejemplo magnesio, zinc, estaño) también emiten fluorescencia al iluminarlas con luz UV, mientras que las queladas con metales paramagnéticos no fluorescen. El núcleo pirrólico de estructura aromática es hidrofóbico, propiedad que se modifica por la presencia de sustituyentes laterales alifáticos portadores de grupos hidrofílicos. Así, la uroporfirina con 8 residuos carboxílicos es, de todas las porfirinas, la más soluble en agua. También son solubles en solventes orgánicos tales como dioxano y éter (Princ, 1995). Los puntos isoeléctricos de las porfirinas están situados entre pH 3,0 y 4,5.

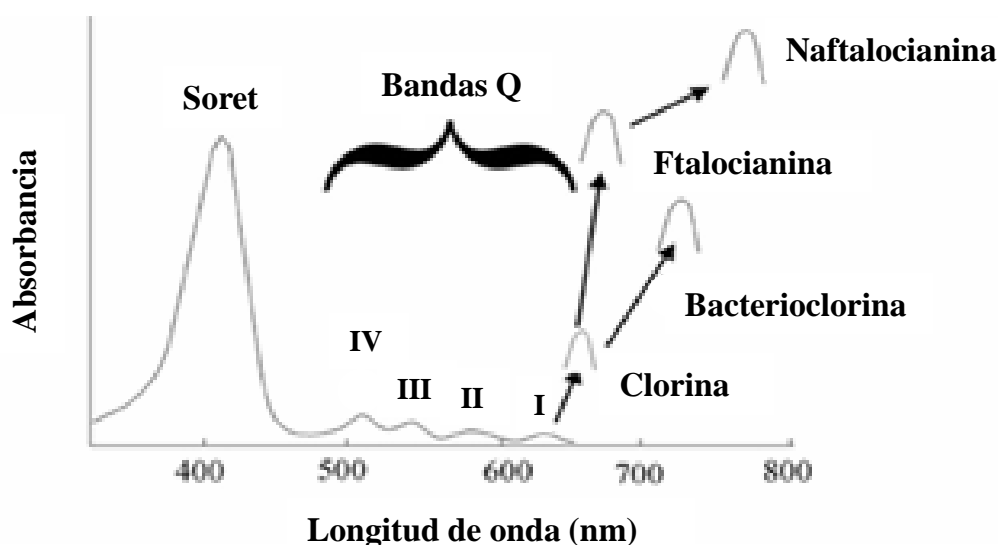


Figura 14. Espectros de absorción de porfirinas. Se muestra el espectro de absorbancia de una típica porfirina con su banda más intensa a 420 nm (banda de Soret) y sus bandas Q secundarias. Se compara con las bandas secundarias de otros FS de uso común en TFD (Berg et al., 2005).

2.5.2 Fotosensibilizantes derivados de porfirinas

Existe una necesidad creciente de desarrollar nuevos FS de uso en TFD que posean mayor selectividad por el tumor, mayor producción de oxígeno singlete y absorción a longitudes de onda más altas. Sobre la base de sus propiedades fotofísicas las porfirinas son uno de los primeros y principales FS de uso comercial y de investigación. Ejemplo de ello son los primeros productos derivados de la hematoporfirina, como el HpD y finalmente su formulación comercial Photofrin® (Figura 4).

Uno de las primeras modificaciones en la estructura base de las porfirinas, en busca de un corrimiento al rojo, en relación a la máxima absorción, fue la

introducción de grupos meso arilos, dando lugar a las meso porfirinas sintéticas, en contraste a las beta porfirinas naturales como el hemo, la clorofila o la vitamina B12. Las tetrafenil porfirinas tienen una absorción en los 630 nm, son eficientes generadoras de oxígeno singulete, pero su uso en principio se ve limitado a la menor solubilidad debida a tales modificaciones (Van Gemert et al., 1985). Para incrementar su solubilidad se ha propuesto el agregado de diferentes grupos, tales como: SO_3 , OH, CO_2H , etc. La introducción de grupos hidroxilo sobre el sustituyente aril incrementó en buena medida la solubilidad (Van Gemert et al., 1985). Banfi et al (2006) demostró que las difenil porfirinas son más activas que las tetrafenil porfirinas, y que los sustituyentes hidroxilo tienen un mayor potencial que los metoxido. A su vez, el efecto de presentar sustituyentes simétricos o asimétricos también parecería contribuir a los efectos globales sensibilizantes (Moser et al., 1998; Milanesio et al., 2003; Lazzeri & Durantini, 2003).

Las porfirinas naturales son ineficientes para atravesar las membranas biológicas, ya que transportan cadenas laterales de carboxilato aniónicas que introducen cargas negativas en la molécula, lo que limita su capacidad para difundir a través de las membranas. En respuesta a este problema, las porfirinas meso sustituidas por grupos catiónicos presentan propiedades interesantes. La interacción específica de porfirinas catiónicas con sustratos biológicos produce un marcado incremento en la actividad fotodinámica (Milanesio et al., 2003; 2010). Estudios de localización intracelular indican que las porfirinas catiónicas (como la DADP) se asocian principalmente a la mitocondria. Esta ubicación preferencial permite una rápida fotosensibilización celular y puede conducir principalmente a un mecanismo de muerte celular apoptótico (Kessel et al., 2003).

Se ha visto también que FS catiónicos a valores de pH fisiológico pueden unirse a superficies de bacterias Gram positivas y negativas, desplazando metales divalentes y desorganizando la pared celular. Es así que Jori et al. (2006) demostraron eficientemente la fotoinactivación de bacterias Gram negativas empleando estos compuestos. Se ha demostrado también, que los FS catiónicos son especialmente eficientes en la erradicación de biopelículas de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Gad et al., 2004).

Entre otras estrategias, Furuta et al. (1994) sintetizaron un compuesto a partir de la modificación del macrociclo de la porfirina por introducción de un átomo de nitrógeno en uno de los pirroles, conservándose intacta la conjugación de 18 electrones π . Estos compuestos interesantes se conocen como porfirinas invertidas

o NCP, y se encuentran en estudio debido a su absorción máxima en los 747 nm (Thomas et al., 2012). Fisher et al. (2017) lograron sintetizar un porfirinoide llamado C₆F₅-NCP con sustituyentes pentafluoroarilos con buenos rendimientos a partir de una reacción síntesis de dos pasos en un mismo matraz, proporcionando un método efectivo para la síntesis de este porfirinoide (Figura 15).

Otra forma de generar un corrimiento hacia el rojo, en relación a la absorción, es la unión con cualquier molécula aromática policíclica, como por ejemplo los naftalenos. Silva et al. (2010) sintetizaron con éxito una novedosa porfirina Np-(o-OH) H2TPP con rendimientos de producción y fotoestabilidad mayores que su porfirina de origen (Figura 15).

La formación de complejos de metaloporfirina, es decir, una porfirina complejada con un ión metálico, ha mostrado cambios en las propiedades fotofísicas al compararla con la porfirina libre (Ali y van Lier, 1999). Por lo general, la presencia de complejos formadores de Zn (II) y Cd (II) con porfirinas produce un aumento en la generación de ¹O₂, mientras que el complejo con Cu (II) presenta una falta de actividad fotodinámica (Milanesio et al., 2001). Sin embargo, y dependiendo del metal de coordinación se producen corrimientos hacia el azul, en relación a la absorción, desapareciendo las bandas Q de mayor longitud de onda. Uno de los FS derivados de metaloporfirinas más prometedores es el paladio-bacteriofeoforbida, un nuevo compuesto que se deriva del pigmento fotosintético bacterioclorofila, que fue aprobado para tratamiento focal del cáncer de próstata en estadio temprano en México en 2016.

Se ha reportado que la captación celular de las tetrafenil porfirinas se incrementa enormemente con la conjugación con aminoácidos, pequeños péptidos o diaminas (Weimin et al., 2008).

Por otro lado, resulta interesante la incorporación de grupos periféricos con actividades biológicas *per se*, que pudiesen además potenciar el efecto de la fotosensibilización. Ejemplos de ello son la unión a fullerenos (P-C₆₀) dando lugar a diadas que aprovechen fenómenos de transferencia de carga inducible, para la dirigir y maximizar el fotodaño (Alvarez et al., 2006)

En la actualidad se han mejorado las metodologías de síntesis de porfirinas, incrementando la capacidad del armado, el rendimiento y la eficiencia en la purificación, sobre todo abaratando costos y reduciendo tiempos. Esto último promueve el surgimiento de una variedad de moléculas innovadoras con alto

potencial como FS en lo que respecta a la TFD (Caminos y Durantini, 2005; Mora et al., 2013; Ferreyra et al., 2014).

Otra clase de FS derivados de las porfirinas son las clorinas y las bacterioclorinas, la diferencia sustancial es que son derivados reducidos. A su vez, presentan la característica que su absorción máxima es cercana a la región IR, sin embargo, su uso en TFD es aún limitado debido a su inestabilidad e hidrofobicidad. Su molécula natural más conocida es la clorofila, de la cual se ha derivado la clorina e6 y su conjugado con el aminoácido aspartato denominado NPe6 (Figura 15). Esta última fue aprobada para el tratamiento del cáncer de pulmón en Japón en 2003 con el nombre de Laserphyrin[®].

Más allá de este compuesto, para aumentar su estabilidad e hidrofiliidad, se han seguido estrategias similares a las meso fenil porfirinas, lo que dio lugar a moléculas interesantes como la m-THPC, con absorciones máximas en los 652 nm (Bonnett et al., 1989). La m-THPC (Figura 15) fue aprobada en 2001 para Europa con el nombre genérico de Temoporfin y propietario de Foscan[®] para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello. Recientemente ha surgido un FS prometedor a base de bacterioclorina, F2BMet (LUZ11) con sustituyentes fluorados y sulfamidas, actualmente se encuentra en fase 2 de los ensayos clínicos (Arnaut et al., 2015).

Otras moléculas derivadas de las porfirinas, aprobadas para diferentes tratamientos incluyen a las benzoporfirinas, como el derivado de monoácido de la benzoporfirina (BPD-MA), de la cual deriva la Verteporfina o Visudyne[®] (Figura 15); y las purpurinas como la etiopurpurina de estaño (SnET2) (Figura 15).

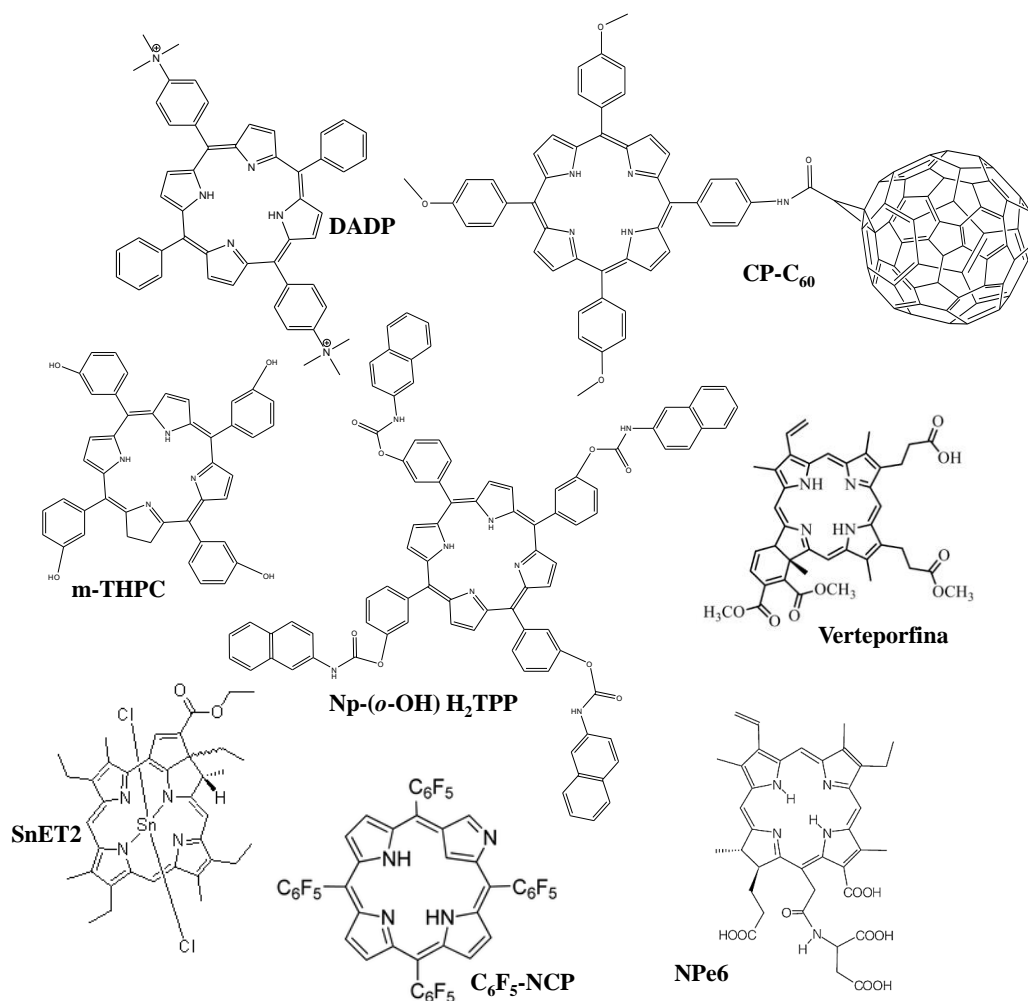


Figura. 15. Estructura de derivados de porfirinas.

2.5.3 Mecanismos de acumulación de las porfirinas en los tumores

Aún no está dilucidada la razón por la cual las porfirinas se concentran preferencialmente en tejido maligno, pero podría deberse en parte a la afinidad porfirina/lipoproteína, debilidad de la vasculatura tumoral, drenaje linfático disminuido; por otro lado, receptores de LDL con mucha actividad o una escasa conversión a hemo debida a una baja actividad de la ferroquelatasa para el caso de los FS endógenos (Wilson et al., 1991).

Existe una hipótesis que propone que los tejidos de rápido crecimiento tienen una alta densidad de receptores para lipoproteínas y adquieren los lípidos necesarios para la síntesis de membranas vía endocitosis inespecífica o mediada por receptor (Spikes y Jori, 1987; Woodburn et al., 1991). Así las porfirinas entrarían junto con las lipoproteínas a la célula.

También se propuso que el bajo pH intratumoral, producto de la pobre oxigenación sumada a una alta actividad glicolítica, estaría afectando la ionización de algunas porfirinas que aumentan su lipofilicidad a pHs bajos, quedando éstas retenidas en el tumor (Pottier & Kennedy, 1990).

Los tumores habitualmente tienen incrementado el número de cuerpos lipídicos, en particular de micelas neutras, además de contar con membranas celulares más hidrofóbicas que las de las células normales. Ambos fenómenos podrían también explicar la acumulación de los fotosensibilizantes hidrofóbicos por este tipo de células (Freitas, 1990).

La debilidad de la vasculatura tumoral, unida a un drenaje linfático disminuido favorecería la formación de agregados de porfirinas o complejos con proteínas en el espacio intersticial (Bugleski et al., 1981)

Las células tumorales también podrían tener aumentada la capacidad de fagocitar o pinocitar los agregados de porfirinas (Jori, 1989). Los macrófagos asociados al tumor podrían ser los responsables de la alta concentración de las porfirinas en este tejido. La fagocitosis de los agregados de porfirinas por los macrófagos residentes sería también el mecanismo responsable de la acumulación de estos compuestos en las placas ateroscleróticas (Hamblin y Newman, 1994).

Dailey y Smith (1984) estudiaron la interacción de algunas porfirinas presentes en el HpD con la ferroquelatasa, viendo que éstas eran o bien sustrato o bien inhibidores competitivos de la enzima. La baja actividad en tejido tumoral podría hacer que éstas permanezcan retenidas en el tumor.

La interacción entre las porfirinas y las glutathione S- transferasas, que están en relativa alta concentración en el tumor (Di Ilio et al., 1985) podría contribuir también a la acumulación de las porfirinas en los tumores.

2.6 Pro-fotosensibilizantes (pro-FS)

2.6.1 Acido 5-aminolevúlico

El ácido 5 aminolevúlico (ALA) no es un FS en sí mismo, sino que es parte de la ruta sintética del FS endógeno Protoporfirina IX (PpIX) (Figura 16). Su empleo en la TFD se basa en la administración exógena como pro-FS. El ALA es el

primer producto en la ruta biosintética del hemo. La síntesis es un proceso que consta de 8 pasos catalizados enzimáticamente, los cuales se distribuyen entre la mitocondria y el citoplasma (Batlle, 1993), donde el intermediario anterior a la formación del grupo hemo es la PpIX. (Figura 17). El primer paso es la condensación de succinil CoA con glicina para formar al ALA, catalizado por la enzima ALA sintetasa. La síntesis de ALA ocurre en la mitocondria y luego es transportado al citoplasma donde la enzima ALA dehidrasa (ALA-D) forma el único monopirrol fisiológico: el porfobilinógeno (PBG). Luego, cuatro moléculas de PBG son condensadas en el sentido cabeza a cola por la enzima PBG deaminasa (PBG-D), formándose el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, el cual por acción de la enzima Uroporfirinógeno III sintetasa se isomeriza y cicla para formar el Uroporfirinógeno III. La enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa cataliza la decarboxilación de las cadenas laterales acetato del Uroporfirinógeno III a grupos metilo, produciendo los intermediarios con 7, 6, 5 y formando el producto final con 4 carboxilos, el Coproporfirinógeno III. Este ingresa a la mitocondria donde la enzima Coproporfirinógeno oxidasa cataliza la decarboxilación oxidativa de las cadenas laterales propionato en las posiciones 2 y 4 a grupos vinilos produciendo el Protoporfirinógeno IX. La Protoporfirinógeno oxidasa oxida este último a PpIX. El paso final es la inserción del hierro ferroso, reacción catalizada por la ferroquelatasa (Fe-Quel).

La ventaja que supone esta metodología respecto al uso directo de un FS, como la Hdp o el Photofrin[®], se basa en dos importantes hechos: el primero es que se administra un compuesto que no tiene actividad fototóxica *per se*; en tanto que, el segundo destaca la selectividad de formación de la PpIX en el sitio blanco tumoral. Este último hecho refiere a que, en la mayoría de los tejidos malignos, aunque también en tejidos en regeneración, se ha encontrado alteraciones en la vía metabólica del hemo que derivan en la acumulación preferencial de la PpIX, por sobre el producto final. Se ha encontrado disminuida la actividad de la Fe-Quel, a la vez que, se ha reportado que la actividad de PBG-D estaba aumentada (Leibovici et al, 1988; Schoenfeld et al, 1988; Navone et al, 1990). De esta manera, al administrar ALA exógenamente, se aprovecha el mayor influjo de producción de esta vía y la acumulación de un producto fotosensibilizante.

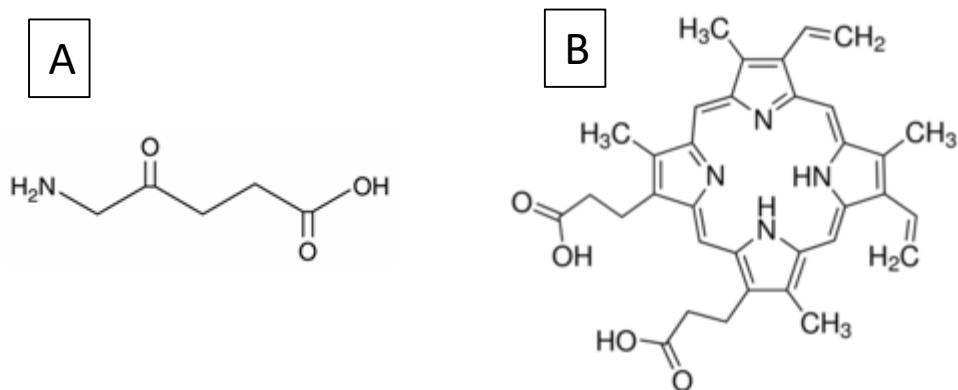


Figura 16. Fórmula estructural del ALA (A) y la PpIX (B).

Ha quedado demostrado en innumerables ensayos a lo largo de estos años que el ALA como pro-FS de la PpIX tiene una eficiencia muy alta en modelos *in vitro* de distintos tipos de tumores tanto animales como humanos (Kennedy et al., 1992; Dougherty et al., 1998; Casas et al., 2000), lo que demuestra el potencial enorme de esta terapia.

Dentro de los beneficios que presenta la fotosensibilización endógena con ALA (ALA-TFD), se puede mencionar que, al tratarse de una molécula pequeña en comparación con el FS parental, el transporte e ingreso a la célula blanco se ve facilitado. El Photofrin[®], por ejemplo se sabe que se une en un 90% a las proteínas plasmáticas en particular a la albúmina, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad. La distribución tisular del porfímero parece correlacionarse con los receptores de lipoproteínas de baja densidad.

Otro aspecto positivo es que la PpIX tiene una estructura molecular definida, con un máximo de absorción en la zona roja del espectro en los 630 nm (Pottier et al., 1986); a diferencia de otros FS como el HpD, el Photofrin[®] o la Visudyne[®]. A su vez, la vida media corta de los efectos fotosensibilizantes de la PpIX, la cual no supera de las 48 h, le da ventajas sobre otros FS de uso clínico (Fukuda et al., 1992; Kennedy et al., 1992). Por ejemplo, el Photofrin[®] tiene una vida media de más de 72 h, y la Visudyne[®] de 250 h.

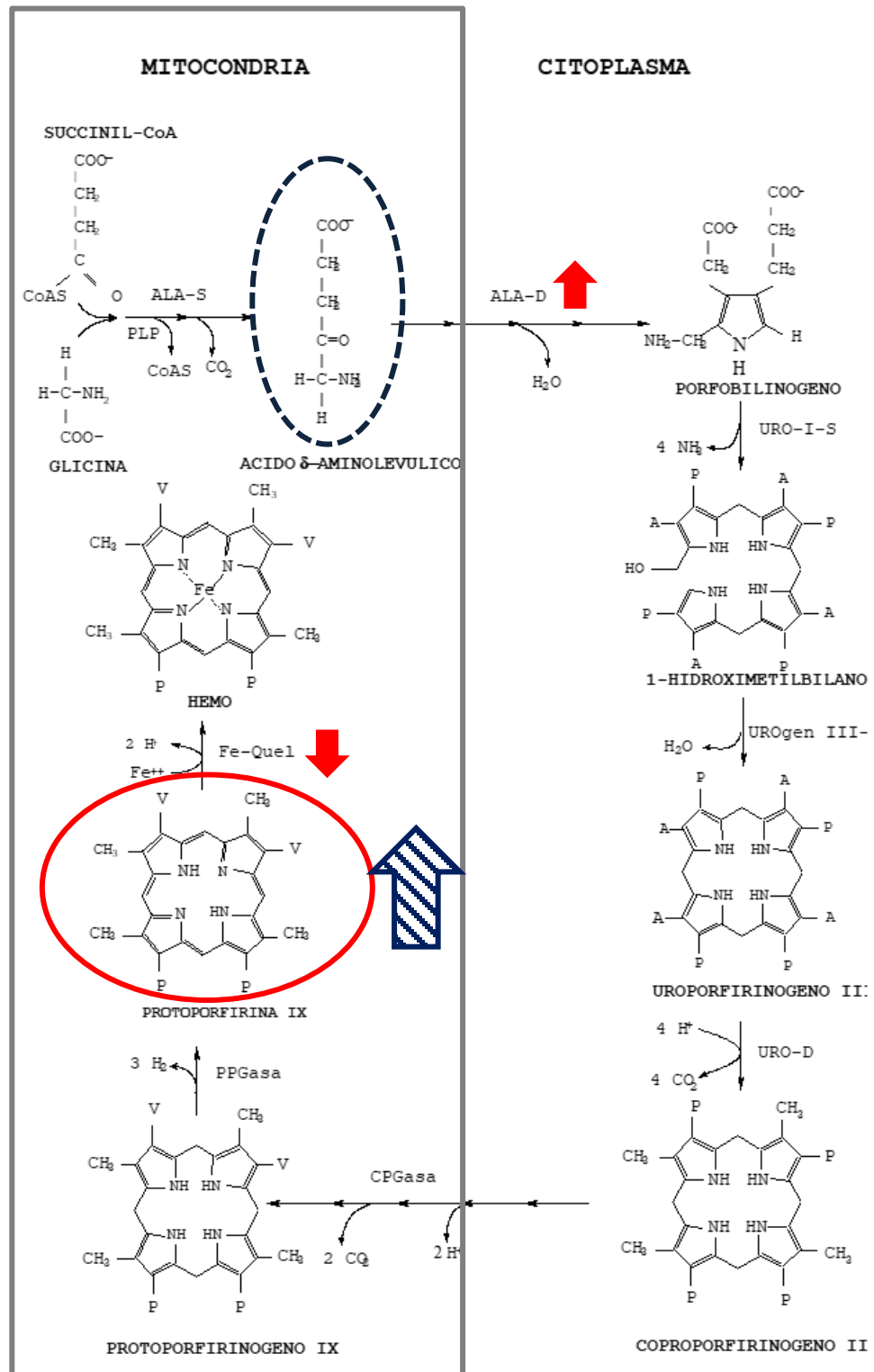


Figura 16. Esquema de la biosíntesis del grupo hemo. Se señala con flecha azul la reacción de síntesis de la PpIX, que es el FS efectivo generado a partir del ALA (Adaptado de Casas et al., 1996).

Kennedy et al. trataron a los primeros pacientes con ALA-TFD. Las enfermedades tratadas incluían queratosis actínica, carcinoma de células basales, enfermedad de Bowen, y carcinoma de células escamosas (Kennedy et al. 1990; 1996). El éxito de estos estudios y otros que prosiguieron, determinó que el ALA recibiera la aprobación de la FDA en 1999, para su utilización en la queratosis actínica en cara y cuero cabelludo utilizando una fuente de luz policromática. Unos años más tarde, fue aprobada para el uso intracraneal como marcador fluorescente en asistencia a la resección de cáncer cerebral en Europa, Canadá y Japón, con el nombre de Gliolan[®]. Esta aplicación se debe a que el ALA atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica.

En 2007, la compañía farmacéutica estadounidense DUSA, mediante permiso de la FDA, comenzó a comercializar el ALA bajo el nombre comercial de Levulan[®] con indicación para la displasia esofaríngea como medicamento huérfano.

La molécula del ALA presenta una biodisponibilidad oral de 50-60%, sufre metabolismo hepático de primer paso y alcanza concentraciones máximas en plasma a las 0,5-2 h luego de la administración. Mayoritariamente es captada por células hepáticas, renales, endoteliales y cutáneas, así como por los tumores (Krammer et al. 2008), y su eliminación es mayoritariamente de forma inalterada en orina (Gliolan[®] ficha técnica; Fotinos et al., 2006).

El ALA es incorporado por distintas células mediante diferentes mecanismos. En levaduras, se demostró por primera vez que el ALA y el GABA comparten un mismo sistema de transporte activo, y que la captación de ALA está mediada por la permeasa UGA4, específica para el GABA (Moretti et al., 2002). En células de adenocarcinoma de colon se observó que el ALA también ingresa a la célula por un mecanismo dependiente de energía a través de transportadores de GABA y β -aminoácidos (Rud et al., 2000). En células de pancreatoma se demostró la participación de los transportadores peptídicos PEPT1 y PEPT2 en este proceso (Whitaker et al., 2000), mientras que en células de adenocarcinoma colorrectal se demostró recientemente la incorporación de ALA a través del transportador SLC36A1 (Frolund et al., 2010).

El ALA (Figura 16), se trata de un delta aminoácido, es decir entre el grupo amino y ácido hay 4 carbonos de separación; debido a la presencia de los grupos ácidos y básicos, a pH fisiológico existe como ión dipolar, quedando con cargas positivas y negativas en diferentes átomos de la molécula. Esto lo vuelve un compuesto con muy alta hidrofiliidad, característica que le brinda una menor difusión de lo esperado a través de las membranas biológicas (Gaulhier et al., 1997),

distribuyéndose de manera inhomogénea en el tejido blanco. Ejemplo de ello, es que se debe aplicar una gran cantidad de ALA en la piel para asegurar una acumulación adecuada en el tejido a tratar (Peng et al., 1995). A su vez, la saturación de la síntesis del hemo, así como también el fotoblanqueo (pérdida de la absorción) de la PpIX son factores limitantes en la eficacia de la ALA-TFD (Di Venosa et al., 2006; Robinson et al., 1998). El uso de altas concentraciones de ALA tiene un efecto tóxico, ya que estructuralmente tiene una semejanza con el neurotransmisor GABA, pudiendo competir y actuar como una neurotoxina (Bachara et al., 1993; Rud et al., 2000). Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno generadas a partir de la forma enólica de ALA se han propuesto como los agentes etiológicos que producen las manifestaciones neuropatológicas (Batlle, 1993).

Con el objetivo de aumentar su tasa de difusión, se han desarrollado derivados del ALA que poseen mayor lipofilicidad, como por ejemplo los derivados ésteres Metil-ALA (Me-ALA) y Hexil-ALA (He-ALA), con pequeñas cadenas carbonadas de 1 y 6 residuos respectivamente (Figura 17). La prodroga derivada del ALA entra más rápidamente a las células y es hidrolizada enzimáticamente a ALA, quedando disponible para la formación de PpIX (Vena et al., 2004). Además, el ALA y sus derivados pueden aplicarse para la FD de tumores (valiéndose de la fluorescencia de la porfirina endógena), aumentando la sensibilidad de detección respecto a las técnicas diagnósticas convencionales (Gilaberte et al., 2006).

El derivado Me-ALA formulado en crema, Metvix[®], cuenta con aprobación y es comercializado en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Brasil para el tratamiento de carcinoma basocelular superficial y nodular, queratosis actínica, y enfermedad de Bowen (Szeimies et al., 2007).

En 2010, la FDA concedió la aprobación de He-ALA para solución intravesical, como un agente de FD para su uso en combinación con el Karl Storz Photodynamic Diagnostic D-Light C System para la detección cistoscópica de cáncer papilar no invasivo muscular de vejiga (Stenzl et al., 2010).

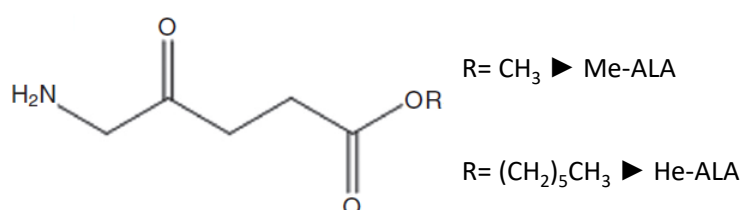


Figura 17. Estructura del Metil-ALA y el Hexil-ALA

2.6.2 Derivados ésteres y peptídicos de ALA

A partir de los éxitos conseguidos con los ésteres Me-ALA y el He-ALA, la investigación en derivados de ALA continuó dando lugar a un número casi ilimitado de derivados con diferentes propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacológicas. Sin embargo, durante el diseño de tales compuestos, se deben tener en cuenta ciertos fundamentos base como: la mejora de estabilidad, la biodisponibilidad y el aumento de la formación de porfirinas fotoactivas, de las que dependen su eficiencia en TFD y FD. Por lo tanto, resulta importante tener en cuenta algunas consideraciones antes de planificar la síntesis de nuevos derivados de ALA, siguiendo un diseño racional (Casas y Batlle, 2006, Fotinos et al., 2006).

Una forma muy sencilla de aumentar la lipofilicidad de un ácido orgánico es la derivatización con alcoholes alquílicos dando lugar al derivado éster. En general, los ésteres de ALA se preparan utilizando reacciones estándar de esterificación entre el ALA y el alcohol correspondiente en presencia de cloruro de tionilo o ácido clorhídrico. De esta manera, se han generado una gran cantidad de derivados lineales, ramificados, cíclicos y sustituidos con etilenglicol (Figura 18).

Es sabido que el aumento del número de carbonos en una cadena carbonada unida a una droga existente, da como resultado un aumento progresivo de la lipofilicidad, y por lo tanto, en la permeabilidad a través de la membrana. Sin embargo, se ha demostrado que el agregado de cadenas demasiado grandes puede provocar la retención en la membrana celular, como ocurre con el derivado Undecanoil-ALA, con 11 residuos carbonados unidos al extremo carboxílico mediante enlace éster (Di Venosa et al., 2006).

La síntesis de porfirinas implica la escisión de los derivados de ALA antes de entrar en el metabolismo del hemo. Si esto no ocurriera así, suponiendo que los derivados de ALA entren en la ruta biosintética sin hidrolizarse, la enzima ALA dehidrasa (ALA-D) será el primer obstáculo de tales compuestos hacia la formación de los tetrapirroles. Jarret et al. (2000) demostraron que la formación de los enlaces C-N inicial es la vía principal para la dimerización de las dos moléculas de ALA para generar el PBG. De hecho, los derivados de ALA estéricamente impedidos o extremadamente grandes no podrían actuar como sustrato para esta enzima sin escisión antes de esta reacción catalizada por enzimas. Otras evidencias como las aportadas por Tunstall et al. (2002) demuestran que tejidos con mayor cantidad de esterasas inducen mayor síntesis de porfirinas.

Otra estrategia para modificar la lipofilidad del ALA es la conversión de su grupo amino en una amida. Esto puede lograrse mediante la condensación de ALA o su éster con anhídrido acético o cloruro de acetilo en condiciones básicas. Kloek et al. (1996) fueron los primeros en seguir este enfoque. Sin embargo, los derivados de N-acetil ALA no lograron inducir porfirinas *in vitro* e *in vivo*. Esta observación puede atribuirse principalmente a la capacidad reducida de las células para escindir la función N-acetilo, que es necesaria para la inducción de la síntesis de porfirina. Sumado a esto, otras observaciones experimentales demostraron que las amidas de ALA y sus ésteres generalmente no inducen grandes cantidades de porfirinas fotoactivas en ausencia de peptidasas específicas (Berger et al., 2000; Ninomiya et al., 2001). Más allá de ser un problema, estas características pueden usarse ventajosamente para aumentar aún más la selectividad de ALA al atacar proteasas específicas que se encuentran sobre-expresadas en algunos tumores.

A partir de estas consideraciones, una estrategia atractiva para mejorar tanto las propiedades fisico-químicas como su selectividad es la generación de conjugados aminoácido-ALA mediante una unión peptídica (Casas et al. 1999; Berger et al. 2000; 2003; Rogers et al. 2005) (Figura 18). La incorporación de una estructura como un aminoácido al ALA no sólo mejoraría su lipofilidad, sino que alteraría su cinética de incorporación celular, pudiendo ser captado por transportadores moleculares específicos para estructuras de este tipo (Whitaker et al., 2000).

En los últimos años, varias aminopeptidasas se han empleado como blanco de terapias antitumorales, siendo específicos de cada estirpe tumoral (Aozuka et al., 2004; Mucha et al., 2010). Las aminopeptidasas N se han asociado con el crecimiento de diferentes cánceres humanos y han sido propuestas como blanco de terapias antitumorales específicas (Wickström et al., 2011). Estas enzimas catalizan la liberación de residuos de aminoácidos neutros localizados en el extremo amino terminal (Berger et al., 2005). De esta manera al utilizar conjugados ALA una vez incorporada por la célula, el ALA puede ser liberado mediante la acción de esterasas y de proteasas citoplasmáticas (Giuntini et al., 2009). Siguiendo este enfoque, Giuntini et al. sintetizaron una variedad de conjugados aminoácido-ALA, los cuales a pH fisiológico no presentan carga, y son más lipofílicos que el ALA libre, conservando sin embargo, la adecuada solubilidad en agua. Estos compuestos son también estables a pH fisiológico, a diferencia de ALA y sus ésteres. Estudios en modelos de explante de piel demostraron la posibilidad del diseño de prodrogas peptídicas de este tipo, las cuales pueden ser usadas en enfermedades con específicos niveles de una determinada actividad enzimática que libere de manera diferencial al ALA (Bourré et al., 2008; 2009).

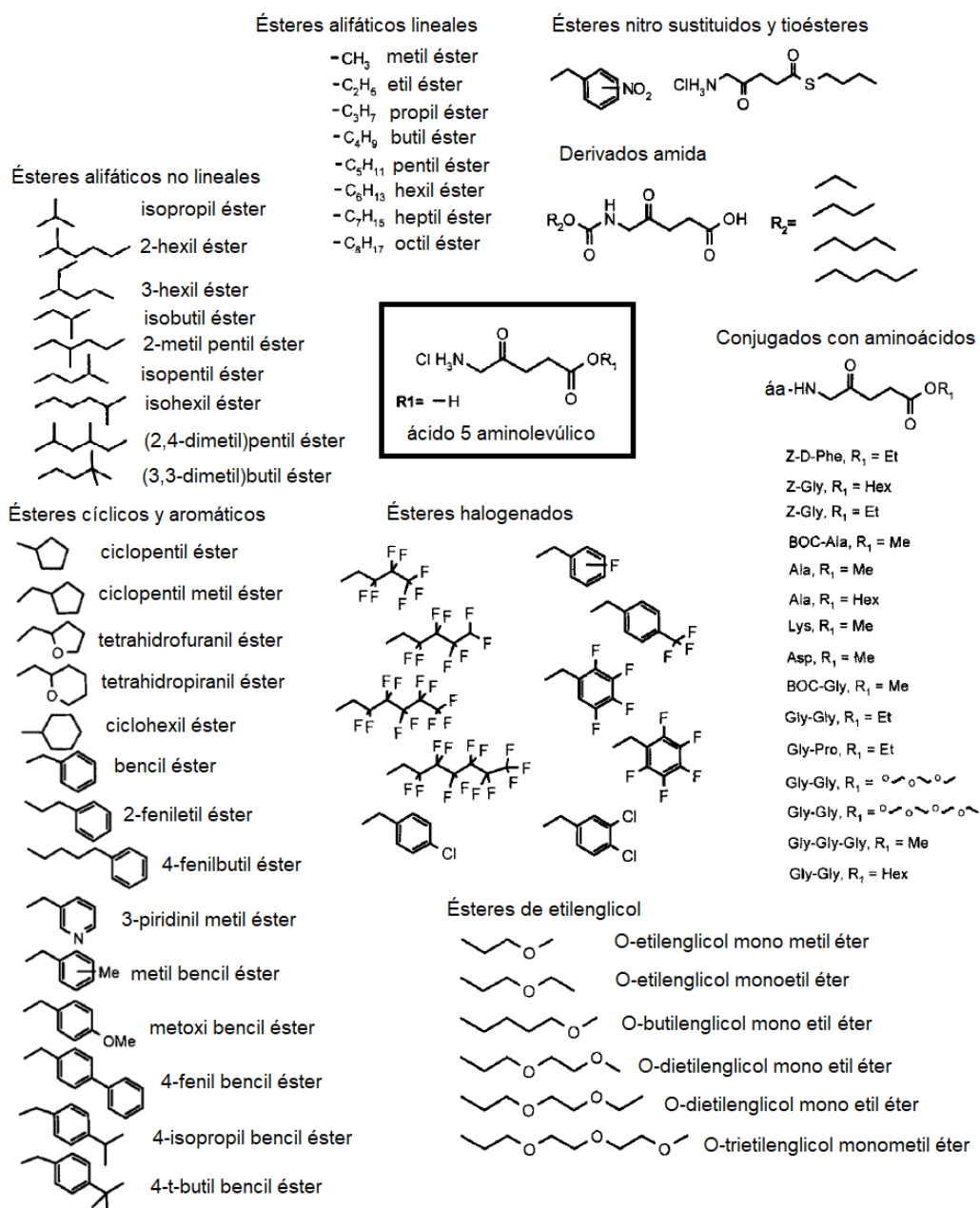


Figura 18. Diversidad de derivados de ALA descriptos en la literatura. Imagen adaptada de Fotinos et al. (2006)

Otro enfoque para mejorar la ALA-TFD se basa en combinar la administración de ALA con el uso de otras moléculas que pueden incrementar la producción de PpIX, mediante, por ejemplo, el bloqueo río abajo de la enzima ferroquelatasa. En relación a esto último, se demostró que varios iones quelantes y agentes quimioterapéuticos pueden ser efectivos en el aumento de los niveles de producción de PpIX a partir de ALA (Berg et. al 1996; Sinha et al. 2006; Curnow et. al 2007; Inoue et al. 2013).

2.6.3 Dendrímeros de ALA

La utilización de vehículos macromoleculares ha demostrado incrementar la incorporación celular de drogas asociadas a ellos, al promover la endocitosis. A su vez, las macromoléculas son fácilmente tomadas por las células tumorales, en relación a las células normales, debido a la permeabilidad aumentada de la vasculatura tumoral y el limitado drenaje linfático que presentan (Backer et al. 2005; Kaminskas et al. 2011)

Se ha intentado emplear liposomas como vehículos moleculares para transportar ALA y sus derivados ésteres. Los resultados obtenidos con liposomas generados a partir de fosfatidilcolina, ácido fosfático y fosfatidilglicerol, demuestran que la eficiencia de incorporación de ALA y derivados es baja (6%), salvo para ésteres muy lipofílicos como el Undecanoil-ALA. Por otro lado, la liberación de porfirinas intracelulares es otro aspecto no deseado de la formulación (Casas et al., 2000, 2002; Casas y Batlle, 2006; Di Venosa et al. 2009).

Otras macromoléculas interesantes para servir de vehículo molecular son los polímeros hiper-ramificados denominadas dendrímeros. Son estructuras que cuentan con una altísima carga útil, lo que sumado al poder controlar y modificar su tamaño definido las hace muy versátiles. Se trata de materiales a nanoescala, es decir menores a los 200 nm, con lo cual resultan 500 veces más grandes que el promedio atómico-molecular, pero 500 veces más pequeñas que una célula eucariota. A su vez, la lipofilicidad del conjugado-dendrímero y su formato particular resultan atractivos para mejorar la incorporación celular y la biodistribución tisular (Boas y P. Heegaard 2004; Duncan et al. 2005).

La estructura mínima de los dendrímeros son los dendrones, que son las sub-unidades de cada ramificación (Figura 19), los cuales se encuentran unidos a un núcleo por medio de espaciadores, conformando una macromolécula tridimensional.

Debido a que el ALA es una molécula relativamente pequeña, resulta un candidato adecuado para la conjugación con macromoléculas de este tipo. En principio, los nanovehículos dendriméricos conteniendo una alta carga útil de ALA por molécula son capaces de vehiculizar una cantidad mayor de ALA a las células. Battah et al. (2001) han diseñado una serie de novedosos dendrímeros conjugados con ALA. Estos compuestos contenían de 3 a 18 residuos de ALA, y algunos de ellos mostraron ser capaces de inducir síntesis de PpIX y fotodaño celular *in vitro*. Estos estudios indicaron una mayor eficiencia y una producción

mayor de PpIX en comparación con ALA libre a concentraciones equivalentes, luego de la administración intraperitoneal (i.p.) (Di Venosa et al. 2006; Battah et al. 2007; Casas et al. 2009).

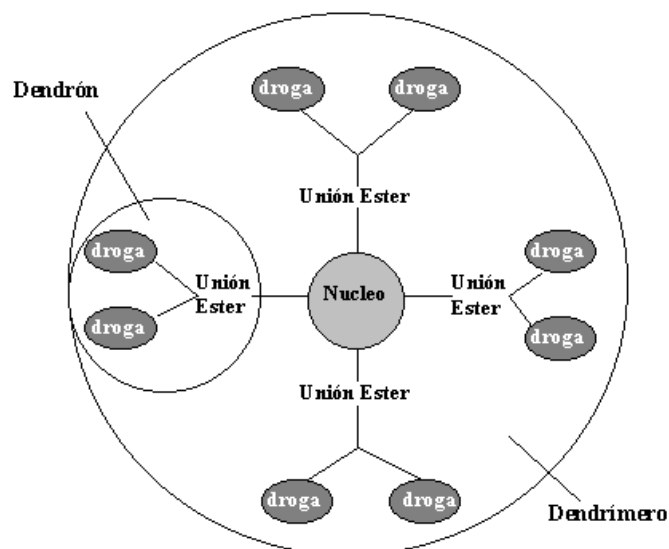


Figura 19. Estructura general de un dendrímero.

2.7 Aplicaciones oncológicas de la TDF

Como ya se ha comentado, actualmente la TFD se encuentra aprobada para una gran variedad de patologías utilizando distintos FS. Los compuestos aprobados hasta el momento para su comercialización por la FDA son: porfímero sódico (Photofrin[®], Axan Pharma Inc.), ALA (Levulan[®], DUSA Pharmaceuticals, Inc), Me-ALA (Metvix[®], PhotoCure ASA), He-ALA (Hexvix[®], PhotoCure ASA), m-THPC (Foscan[®], Biolitec AG), Verteporfina (Visudyne[®], Novartis Pharmaceuticals). Además, algunos han recibido aprobación para su uso en Europa, Japón y México, y una gran cantidad se encuentran en diferentes etapas de ensayos clínicos (Tabla 2).

Tabla.2. Principales FS comerciales y en fase clínica. Adaptado de Dabrowski et al., 2015 y www.clinicaltrials.gov.

FS	Estructura	λ_{\max}^a	ϵ_{\max}^b	Dosis ^c	Dosis lumínica ^d	IDL ^e	Aplicaciones
Porfímero sódico Photofrin®	Porfirina	630	3000	2-5	100-200	24-48	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de esófago, CPCN endobronquial • Ablación de displasia de alto grado en el esófago de Barrett • Carcinoma de vejiga (huérfano) • Colangiocarcinoma (huérfano) • Mesotelioma (huérfano)
Ácido 5 aminoluvúlico (ALA) Levulan®	Precursor de porfirina	635	-	(solución 20% tópica)	37	3	<ul style="list-style-type: none"> • Queratosis actínica • Lentigo Maligna • Queratitis actínica • Carcinoma de células escamosas in situ (SCC-is) • Cáncer de cerebro (FD)
Metil aminolevulinato (Me-ALA) Metvixia®	Precursor de porfirina	570-670	-	(solución 16,8% tópica)	75	4	<ul style="list-style-type: none"> • Queratosis actínica • Queratitis actínica
Hexil aminolevulinato (He-ALA) Cysview®	Precursor de porfirina	360-450 (FD)	-	(2 mg/ml intravesical)	-	-	Agente de diagnóstico de cáncer de vejiga
Temoporfina (m-THPC) Foscan®	Clorina	652	30000	8-12	8-12	24-48	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello • Colangiocarcinoma (Ensayo Clínico)
Ftalocianina de Silicio (Pc4)	Ftalocianina	675	200000	0,5-2	100	24-72	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma no Hodgkin cutáneo de células T en estadio I y II (Ensayo Clínico) • Cáncer de piel no melanomatoso (Ensayo Clínico) • Cáncer de cabeza y cuello (Ensayo Clínico)
Verteporfina (BPD-M) Visudyne®	Clorina	688	33000	0,1-2	100-200	0,5-3	<ul style="list-style-type: none"> • Degeneración macular • Histoplasmosis ocular • Cáncer de próstata, melanoma (Ensayo Clínico)
Talaporfina (NP6) Laserporfirina®	Clorina	660	40000	0,5-3,5	25-100	24-72	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma hepatocelular • Neoplasias De Hígado • Metástasis hepáticas • Neoplasias colorrectales • Neoplasia metástasis • Neoplasias Locales Recurrentes • Cáncer de pulmón
Padeliporfina (WST11) Stakel®	Bacterioclorina	762	110000	4	200	0,25	<ul style="list-style-type: none"> • Degeneración macular (Ensayo Clínico) • Neovascularización Coroidea (Ensayo Clínico)
Radaporfina LUZ11®	Bacterioclorina	743	140000	0,5	50	0,25	Cáncer de cabeza y cuello (Ensayo Clínico)
2-(1- Hexilxietil)-2- devinilpirofofo rbida (HPPH) Photochlor®	Feoforbida	655	S/D	S/D	S/D	24-72	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de pulmón (Ensayo Clínico) • Cáncer de esófago (Ensayo Clínico)
Motexafina lutecio Lutrin®	Taxafirina	730	S/D	S/D	S/D	0,25-1	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer de cuello uterino (Ensayo Clínico) • Neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 y 3 (Ensayo Clínico) • Cáncer de próstata en estadio I, IIA, IIB (Ensayo Clínico)

^aLongitud de onda utilizada para la irradiación (nm); ^bCoefficiente de absorción molar, en la banda de Soret ($M^{-1} cm^{-1}$); ^cDosis de droga (mg/kg); ^dDosis lumínica (J/cm^2); ^eIntervalo dosis-luz (h)

La TFD presenta numerosas ventajas con respecto a los tratamientos tradicionales, requiere la administración de la droga y posterior iluminación de la zona a tratar, pudiendo realizarse de manera ambulatoria, mientras que los regímenes de radiación o de quimioterapia resultan más complejos, ya que requieren tiempos más prolongados de tratamiento, y en muchos casos, hospitalización. Los efectos localizados de la TFD también constituyen una gran ventaja, ya que a diferencia de la radioterapia, no se ponen en riesgo los tejidos sanos adyacentes y se evita la toxicidad sistémica que produce la administración de drogas en la quimioterapia. Otra gran ventaja, consiste en que la TFD se puede repetir en la misma zona en caso de recurrencia del tumor, mientras que repetir la radioterapia o la quimioterapia puede resultar extremadamente complejo, con un gran riesgo de dañar los tejidos circundantes (Triesscheijn et al., 2006).

Cáncer de vejiga: fue el primer tipo de cáncer en el que se aprobó el uso de la TFD, en 1993, utilizando el porfímero sódico. Ensayos realizados tanto con derivado de hematoporfirina (HpD) como con un porfímero sódico, demostraron que la TFD producía una respuesta inicial mejor que los tratamientos convencionales en cáncer de vejiga superficial y recurrente (Dougherty, 1984; Benson y Ralph, 1986). Sin embargo, debido a ciertos efectos adversos como la irritación y contracción de la vejiga, y la relativamente alta tasa de reincidencia a un año (70-80%), se propusieron otros protocolos utilizando dosis de droga y de luz menores (Mc Bridge, 2002). Más recientemente, se realizaron ensayos clínicos utilizando ALA como tratamiento único, o en combinación con Mitomicina c, en los que se obtuvo una respuesta completa en el 40% al 52% de los casos a los 18-24 meses, sin reducción persistente de la vejiga (Waidelich et al., 2003; Skyrme et al., 2005).

Cáncer de piel: En el primer ensayo clínico con TFD se obtuvieron tasas de respuesta mayores al 85% utilizando HpD como FS y luz roja (Dougherty et al., 1978). Desde entonces, numerosos estudios han confirmado que las tasas de respuesta de cáncer de piel superficial a la TFD son equivalentes a las obtenidas con los métodos tradicionales (crioterapia, escisión quirúrgica), pero con mejores resultados cosméticos (Rhodes et al., 2004). Para lesiones bien focalizadas, la aplicación tópica de los FS, como el ALA y el Me-ALA, constituye una buena alternativa, evitando la administración sistémica que presenta mayores limitaciones. El uso de ALA a nivel local ha demostrado ser sumamente efectivo para el carcinoma de células basales, con escasos efectos adversos (Taub, 2004). Este pro-FS también ha generado tasas de respuesta altas (75% -88%) en el tratamiento de la enfermedad de Bowen (Morton et al., 2000; Salim et al., 2003). Para el tratamiento de lesiones múltiples, o de grandes superficies, se considera

más apropiada y efectiva la administración sistémica del porfímero sódico o m-THPC (Zeitouni et al., 2001; Baas et al., 2001).

Cáncer de cabeza y cuello: La cirugía y la radioterapia son los tratamientos convencionales para este tipo de cáncer en etapas tempranas. La TFD presenta la misma efectividad que estas terapias, pero con la ventaja de resultar menos invasiva, no afectar a los tejidos sanos circundantes y ofrecer excelentes resultados cosméticos (Copper et al., 2003; Hopper et al., 2004). Actualmente el FS más utilizado es el m-THPC. En el tratamiento con TFD de tumores primarios en etapas tempranas de la cavidad oral y orofaringe se han obtenido tasas de respuesta del 85% a un año, y del 96% en cáncer de labio. También se obtuvieron muy buenas respuestas en el tratamiento de tumores recurrentes o primarios múltiples, así como en la terapia de rescate para pacientes que no respondieron a las terapias convencionales (Schuller et al., 1985; Kübler et al., 2001; Hopper et al., 2004).

Cáncer de esófago: Es una enfermedad con mal pronóstico, con una tasa de sobrevida de 12,5% a 5 años (Sihvo et al., 2004). Los primeros estudios sobre el uso de la TFD en esófago se realizaron para el tratamiento paliativo de tumores obstructivos, obteniéndose buenos resultados (McCaughan et al., 1989). Para el tratamiento de tumores superficiales se realizaron estudios utilizando porfímero sódico y m-THPC, con buenas tasas de respuesta en ambos casos (85% a los 6 meses), y una tasa de sobrevida del 25% a 5 años (Sibille et al., 1995; Grosjean et al., 1996).

Esófago de Barrett: Se considera una condición pre-maligna, ya que el 50% de los casos de cáncer de esófago desarrollan previamente esta enfermedad (Brown y Devesa, 2002). En ensayos clínicos se demostró que la TFD con el porfímero sódico brinda mejores resultados que el tratamiento sólo con omeprazol, disminuyendo significativamente el riesgo de desarrollar cáncer. Teniendo en cuenta que esta enfermedad se desarrolla a nivel superficial, el uso de ALA en forma local ofrece una alternativa menos tóxica, aunque aún no se han logrado los resultados deseados (Ortner et al., 2002; Overholt et al., 2005).

Cáncer endobronquial: La TFD ha demostrado ser útil en distintas etapas de esta enfermedad. La utilización del porfímero sódico o HpD en el tratamiento paliativo de tumores obstructivos resultó segura y alivió los síntomas en casi todos los pacientes estudiados (Kato et al., 1998; Moghissi et al., 1999). La TFD también ha sido utilizada en el tratamiento de cáncer de pulmón en estadíos tempranos, logrando una tasa de sobrevida promedio a 5 años en el rango de 56% al 70%, y

del 90% en pacientes con carcinoma *in situ* (Furuse et al., 1993; Kato et al., 1998, Moghissi, 2004).

Linfomas Cutáneos de Células T (LCCT): Al tratarse de una patología cutánea es un blanco potencial para la TFD. Estos linfomas representan el 4% de los desórdenes no Hodgkin, estando el 60% representado por la Micosis Fungoide (MF) y Síndrome de Sézary (SS). La patología se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfoide T (CD3, CD4, CD54RO) intradérmico en etapas tempranas, infiltrando a través de la dermis, tejido subcutáneo, y órganos adyacentes en etapas avanzadas (Willemze, 2005). Las terapias tradicionales abarcan la radioterapia y el uso de quimioterápicos (antraciclinas o análogos de nucleósidos) pero proveen respuestas terapéuticas de corta duración (Zinzani et al, 2000, 2009; Wollina et al, 2003).

Se ha probado en pacientes con MF la formulación del ALA al 20% en emulsión conocida como Levulan® (Orenstein 2000; Edström et al., 2008) y para el Me-ALA la formulación al 16,8% en crema comercial Metvix® (Fernandez-Guarino et al., 2010; 2013) lográndose respuestas al tratamiento entre el 60-80%. Por otro lado, se ha reportado la capacidad de la TFD de fotosensibilizar diferencialmente linfocitos transformados en relación a los normales, además de activar la inmunidad local vía activación de interferón (Casas et al., 2002, Gamaleia et al., 2008).

Otras aplicaciones oncológicas: La TFD presenta un gran potencial terapéutico para el tratamiento de otros tipos de cáncer, sobre todo aquellos de peor pronóstico y también cuando los tratamientos convencionales producen alta morbilidad. Se han realizado ensayos clínicos utilizando porfímero sódico en pacientes con colangiosarcoma, en los que se obtuvieron buenos resultados paliativos. Este FS también demostró eficacia en el tratamiento de tumores pituitarios recurrentes (Wiedmann et al., 2004). El uso de m-THPC resultó efectivo y seguro para el tratamiento de cáncer de próstata recurrente, en estudios de fase I, y también para cáncer de páncreas (Bown et al., 2002). Otras aplicaciones oncológicas de la TFD incluyen: neoplasia cervical, neoplasia vulvar, carcinoma anal *in situ*, neoplasia de pene y cáncer de mama metastásico (Taub, 2007).

2.8 Aplicaciones no oncológicas de la TFD

Enfermedades infecciosas: La capacidad de la TFD de eliminar bacterias, hongos, virus y parásitos se denomina fotoinactivación bacteriana. Ésta se propuso para el tratamiento de infecciones bacterianas superficiales orales o cutáneas, o para el tratamiento de zonas accesibles con fibras ópticas que guían la llegada de la luz al blanco, tales como prótesis ortopédicas o implantes dentales. En los últimos años esta técnica ha adquirido importancia debido a la aparición de múltiples resistencias a los antibióticos convencionales (Wainwright, 2002; Jori et al., 2011).

Aterosclerosis: Un uso emergente de la TFD es la fotoangioplastia (FAP), la cual podría mejorar el tratamiento de angioplastia tradicional, ya que provoca menos riesgo de reestenosis (reestrechamiento de la arteria). El gran potencial de la FAP se basa en tres hechos importantes: el primero es que el alto contenido lipídico de la placa ateromatosa tiende a unir FS lipofílicos, ya que se ha reportado que ciertos FS viajan por la sangre unidos a lipoproteínas. El segundo hecho remarcable es que los macrófagos, componente presente en la placa ateromatosa como tal y como células espumosas, son capaces de captar macromoléculas con avidez. Finalmente el tercer punto relevante es el desarrollo del láser acoplado a fibras ópticas que ha permitido la posibilidad de aplicación de la TFD en dichas lesiones. La TFD ha sido empleada para el tratamiento de ratones con hipercolesterolemia (Straight et al., 1986; Rockson et al., 2000; Mansfield, 2001) y finalmente en aterosclerosis de arterias periféricas en humanos, mostrando que la FAP podría constituir una alternativa o complemento para las intervenciones en la patología (Kipshidze y Sahota, 2001; Pai et al., 2005). La TFD endovascular está también siendo tomada en consideración como un método de estabilizar las placas al inhibir la inflamación (Drakopoulou et al. 2011).

Estética: El desarrollo cosmético exitoso de esta terapia, sentó las bases para la aplicación de los FS como fotorejuvenecedores. Esto ha surgido a partir de la observación de las significativas mejoras en los signos de fotoenvejecimiento en la piel adyacente a lesiones causadas por queratosis actínica, tratadas con TFD (Gold, 2008).

Desórdenes inflamatorios/inmunológicos: Algunos ejemplos de estas patologías que han sido exitosamente tratadas con TFD son: psoriasis, acné, liquen plano, escleroderma, alopecia y degeneración macular de la retina (Taub, 2007).

Ginecología: La ablación del endometrio mediante TFD es una técnica que evita la cirugía y constituye una alternativa a la histerectomía para mujeres con hemorragias uterinas disfuncionales (Soergel et al., 2008).

Finalmente, otros usos promisorios de la TFD incluyen el barrido de lecho tumoral quirúrgico, tratamiento de carcinomatosis peritoneales a partir de la novedosa modalidad TFD intraoperatoria. (Hahn et al, 2006), y la depuración de células tumorales residuales en leucemias luego de autotransplante de médula ósea.

3. Referencias

- ACKROYD, R, et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2001, vol. 74, no 5, p. 656-669.
- AGENCIA INTERNACIONAL PARA LA INVESTIGACIÓN SOBRE EL CÁNCER, [consulta: Julio 2018]. Disponible en: <http://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases>
- ALI, H; VAN LIER, J. Metal complexes as photo-and radiosensitizers. *Chemical Reviews*, 1999, vol. 99, no 9, p. 2379-2450.
- ALONSO CASTELLANOS, S, et al. Efectos adversos metabólicos y nutricionales asociados a la terapia biológica del cáncer. *Nutrición hospitalaria*, 2014, vol. 29, no 2, p. 259-268.
- ALVAREZ, G, et al. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 12, p. 2092-2101.
- AOZUKA, Y, et al. Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer letters*, 2004, vol. 216, no 1, p. 35-42.
- ARNAUT, LG, et al. The role of the immune system in the therapeutic outcome of PDT with a fluorinated bacteriochlorin (F2BMet) in clinical trials. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015, vol. 12, no 3, p. 334.
- ATHAR, M, et al. A novel mechanism for the generation of superoxide anions in hematoporphyrin derivative-mediated cutaneous photosensitization. Activation of the xanthine oxidase pathway. *The Journal of clinical investigation*, 1989, vol. 83, no 4, p. 1137-1143.
- AULER, H; BANZER, G. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 1942, vol. 53, no 2, p. 65-68.
- BAAS, P, et al. Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. *British Journal of Dermatology*, 2001, vol. 145, no 1, p. 75-78.
- BACKER, M, et al. Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Molecular cancer therapeutics*, 2005, vol. 4, no 9, p. 1423-1429.

BANFI, S, et al. Comparison between 5, 10, 15, 20-tetraaryl-and 5, 15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure– activity relationship modeling. *Journal of medicinal chemistry*, 2006, vol. 49, no 11, p. 3293-3304.

BATLLE, AMC. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy—a model for carcinogenesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1993, vol. 20, no 1, p. 5-22.

BATTAH, S, et al. Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Molecular cancer therapeutics*, 2007, vol. 6, no 3, p. 876-885.

BATTAH, S, et al. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate chemistry*, 2001, vol. 12, no 6, p. 980-988.

BECHARA, E, et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim Nova*, 1993, vol. 16, no 1, p. 385-392.

BENSON JR; RALPH C. Laser photodynamic therapy for bladder cancer. En *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 1986. p. 859-864.

BERG, K, et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of microscopy*, 2005, vol. 218, no 2, p. 133-147.

BERG, K, et al. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *British journal of cancer*, 1996, vol. 74, no 5, p. 688.

BERGER, Y, et al. Determination of intracellular prolyl/glycyl proteases in intact living human cells and protoporphyrin IX production as a reporter system. *Chemistry & biology*, 2005, vol. 12, no 8, p. 867-872.

BERGER, Y, et al. Ethylene glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *Journal of medicinal chemistry*, 2000, vol. 43, no 25, p. 4738-4746.

BERGER, Y, et al. Evaluation of dipeptide-derivatives of 5-aminolevulinic acid as precursors for photosensitizers in photodynamic therapy. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2003, vol. 11, no 7, p. 1343-1351.

BIANCONI, E, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology*, 2013, vol. 40, no 6, p. 463-471.

BOAS, U; HEEGAARD, P. Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*, 2004, vol. 33, no 1, p. 43-63.

BONNETT, R, et al. Hydroporphyrins of the meso-tetra (hydroxyphenyl) porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochemical Journal*, 1989, vol. 261, no 1, p. 277-280.

BOURRE, L, et al. 5-Aminolaevulinic acid peptide prodrugs enhance photosensitization for photodynamic therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 2008, vol. 7, no 6, p. 1720-1729.

BOURRÉ, L, et al. Protoporphyrin IX enhancement by 5-aminolaevulinic acid peptide derivatives and the effect of RNA silencing on intracellular metabolism. *British journal of cancer*, 2009, vol. 100, no 5, p. 723.

BOWN, S, et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut*, 2002, vol. 50, no 4, p. 549-557.

BUETTNER, G; NEED, M. Hydrogen peroxide and hydroxyl free radical production by hematoporphyrin derivative, ascorbate and light. *Cancer letters*, 1985, vol. 25, no 3, p. 297-304.

BUGELSKI, P, et al. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.*, 1981.

CAMINOS, D; DURANTINI, E. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, no 05, p. 334-342.

CÁNCER, Instituto Nacional del Cáncer, [consulta: Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer>

CASAS, A, et al. ALA and ALA hexyl ester in free and liposomal formulations for the photosensitisation of tumour organ cultures. *British journal of cancer*, 2002, vol. 86, no 5, p. 837.

CASAS, A, et al. Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *British journal of cancer*, 1999, vol. 80, no 10, p. 1525.

CASAS, A, et al. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 2009, vol. 135, no 2, p. 136-143.

CASAS, A, et al. The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. *British Journal of Dermatology*, 2000, vol. 143, no 3, p. 564-572.

CASAS, A. Metabolismo del hemo y neoplasias. 1996. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

CASAS, A; BATLLE, AMC. Aminolevulinic acid derivatives and liposome delivery as strategies for improving 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *Current medicinal chemistry*, 2006, vol. 13, no 10, p. 1157-1168.

COPPER, M, et al. Meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 2003, vol. 129, no 7, p. 709-711.

CURNOW, A, et al. Biochemical manipulation via iron chelation to enhance porphyrin production from porphyrin precursors. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2007, vol. 26, no 2.

DĄBROWSKI, J, et al. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2015, vol. 14, no 10, p. 1765-1780.

DAILEY, H; SMITH, A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochemical Journal*, 1984, vol. 223, no 2, p. 441-445.

DANIELL, MD; HILL, JS. A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 1991, vol. 61, no 5, p. 340-348.

DI ILIO, C, et al. Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase activities in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer letters*, 1985, vol. 29, no 1, p. 37-42.

DI VENOSA, G, et al. Comparison of liposomal formulations of ALA Undecanoyl ester for its use in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, vol. 96, no 2, p. 152-158.

DI VENOSA, G, et al. Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, vol. 83, no 2, p. 129-136.

DOROSHOW, J. H. Approach to the patient with cancer. *Goldman-Cecil Medicine*. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2016.

DOSNE PASQUALINI, C. La etiología del cáncer: Vigencia de cinco paradigmas sucesivos. *Medicina* (Buenos Aires), 2003, vol. 63, no 6, p. 757-760.

DOUGHERTY, T, et al. Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the national cancer institute*, 1998, vol. 90, no 12, p. 889-905.

DOUGHERTY, T, et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer research*, 1978, vol. 38, no 8, p. 2628-2635.

DOUGHERTY, T, et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *Journal of the National Cancer Institute*, 1975, vol. 55, no 1, p. 115-121.

DRAKOPOULOU, M, et al. Vulnerable plaque and inflammation: potential clinical strategies. *Current pharmaceutical design*, 2011, vol. 17, no 37, p. 4190-4209.

DUNCAN, R, et al. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 2005, vol. 57, no 15, p. 2215-2237.

EDSTRÖM, D, et al. Long-term follow-up of photodynamic therapy for mycosis fungoides. *Acta dermato-venereologica*, 2008, vol. 88, no 3, p. 288-290.

FERNANDEZ-GUARINO, M, et al. Plaque-phase mycosis fungoides treated with photodynamic therapy: results from 12 patients. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 2010, vol. 101, no 9, p. 785-791.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M, et al. Terapia fotodinámica en micosis fungoides. *Actas dermo-sifiliograficas*, 2013, vol. 104, no 5, p. 393-399.

FERREYRA, D, et al. Synthesis and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [3-(N-ethyl-N-methylcarbazoyl)] chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, vol. 282, p. 16-24.

FISHER, J, et al. Two-Step, One-Flask Synthesis of an N-Confused Porphyrin Bearing Pentafluorophenyl Substituents. *The Journal of organic chemistry*, 2017, vol. 82, no 8, p. 4429-4434.

FOTINOS, N, et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochemistry and photobiology*, 2006, vol. 82, no 4, p. 994-1015.

FREITAS, I. Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 1990, vol. 7, no 2-4, p. 359.

FRØLUND, S, et al. δ -Aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *British journal of pharmacology*, 2010, vol. 159, no 6, p. 1339-1353.

FUKUDA, H, et al. Tumour-localizing properties of porphyrins in vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, vol. 102, no 2, p. 433-436.

FURUTA, H, et al. "N-Confused Porphyrin": A New Isomer of Tetraphenylporphyrin. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, vol. 116, no 2, p. 767-768.

- GAD, F, et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004, vol. 48, no 6, p. 2173-2178.
- GAMALEIA, N, et al. Sensitivity of normal and malignant human lymphocytes to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic damage. *Experimental oncology*, 2008.
- GAULLIER, JM, et al. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer research*, 1997, vol. 57, no 8, p. 1481-1486.
- GILABERTE, Y, et al. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas dermo-sifiliográficas*, 2006, vol. 97, no 2, p. 83-102.
- GIUNTINI, F, et al. Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolism. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, vol. 52, no 13, p. 4026-4037.
- GLIOLAN® ficha técnica.
(http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000744/human_med_000807.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid%20=WC0b01ac058001d124)
- GOLD, M. The use of photodynamic therapy in the treatment of actinic keratoses and photorejuvenation. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2008, vol. 1, p. 32-7.
- GOMER, CJ. Photodynamic therapy in the treatment of malignancies. *Sem. Oncol.*, 1989, vol. 26, p. 27-31.
- GROSJEAN, P, et al. Photodynamic therapy for cancer of the upper aerodigestive tract using tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 1996, vol. 14, no 5, p. 281-287.
- HAHN, S, et al. A phase II trial of intraperitoneal photodynamic therapy for patients with peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Clinical Cancer Research*, 2006, vol. 12, no 8, p. 2517-2525.
- HAMBLIN, M; NEWMAN, L. New trends in photobiology: On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1994, vol. 23, no 1, p. 3-8.
- HAUSMAN W. Die sensibilisierende wirkung des hamatoporphyrins. *Biochem Zeit*, 1911, p. 276-316.
- HOPPER, C, et al. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*, 2004, vol. 111, no 1, p. 138-146.
- INOUE, K, et al. Photodynamic therapy involves an antiangiogenic mechanism and is enhanced by ferrochelatase inhibitor in urothelial carcinoma. *Cancer science*, 2013, vol. 104, no 6, p. 765-772.
- JARRET, C, et al. Inhibition of Escherichia coli porphobilinogen synthase using analogs of postulated intermediates. *Chemistry & biology*, 2000, vol. 7, no 3, p. 185-196.
- JORI, G, et al. Photodynamic inactivation of microbial pathogens: disinfection of water and prevention of water-borne diseases. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2011, vol. 30, no 3.
- JORI, G. In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumours photosensitizers. *Ciba Found Symp.*, 1989, vol. 146, p. 78-94

- KAMINSKAS, L, et al. Targeting the lymphatics using dendritic polymers (dendrimers). *Advanced drug delivery reviews*, 2011, vol. 63, no 10-11, p. 890-900.
- KATO, S, et al. Fluorescence diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in a mouse model of colon cancer. *Journal of surgical research*, 2012, vol. 176, no 2, p. 430-436.
- KENNEDY, J, et al. New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1992, vol. 14, no 4, p. 275-292.
- KENNEDY, J, et al. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 1996, vol. 14, no 5, p. 289-304.
- KENNEDY, J, et al. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1990, vol. 6, no 1-2, p. 143-148.
- KENNEDY, JC. En: Photodynamic Therapy with ALA. A Clinical Handbook. Pottier R, Kramer B, Baumgartner R, Stepp H. *Royal Society of Chemistry*, 2006, p 1-14.
- KESSEL, D, et al. Localization and Photodynamic Efficacy of Two Cationic Porphyrins Varying in Charge Distribution¶. *Photochemistry and photobiology*, 2003, vol. 78, no 5, p. 431-435.
- KIPSHIDZE, N; SAHOTA, H. Photoangioplasty recount: clear punch or dimpled chad?. *Circulation*, 2001, vol. 104, no 11, p. e55-e56.
- KLOEK, J, et al. Prodrugs of 5-Aminolevulinic Acid for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 1996, vol. 64, no 6, p. 994-1000.
- KRAMMER, B, et al. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2008, vol. 7, no 3, p. 283-289.
- KÜBLER, A, et al. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2001, vol. 30, no 6, p. 504-509.
- LAZZERI, D; DURANTINI, E. Synthesis of meso-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. *Arkivoc*, 2003, vol. 10, p. 227-239.
- LEIBOVICI, L, et al. Activity of porphobilinogen deaminase in peripheral blood mononuclear cells of patients with metastatic cancer. *Cancer*, 1988, vol. 62, no 11, p. 2297-2300.
- LOZANO, C. Seguridad de las terapias biológicas: nuevos datos de Biobadaser. *Reumatología Clínica*, 2011, vol. 6, p. 1-6.
- MANSFIELD, R, et al. Photodynamic therapy: shedding light on restenosis. *Heart*, 2001, vol. 86, no 6, p. 612-618.
- MCBRIDE, G. Studies expand potential uses of photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, vol. 94, no 23, p. 1740-1742.
- MCCAUGHAN, J, et al. Photodynamic therapy for esophageal tumors. *Archives of Surgery*, 1989, vol. 124, no 1, p. 74-80.
- MEYER-BETZ, F, et al. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut-und Gallenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med*, 1913, vol. 112, p. 476-503.

MIDDELBURG, T, et al. Fractionated illumination at low fluence rate photodynamic therapy in mice. *Photochemistry and photobiology*, 2010, vol. 86, no 5, p. 1140-1146.

MILANESIO, E, et al. Methoxyphenyl porphyrin derivatives as phototherapeutic agents. *Current Bioactive Compounds*, 2010, vol. 6, no 2, p. 97-105.

MILANESIO, E, et al. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2003, vol. 2, no 9, p. 926-933.

MILANESIO, E, et al. Photodynamic Studies of Metallo 5, 10, 15, 20-Tetrakis (4-methoxyphenyl) porphyrin: Photochemical Characterization and Biological Consequences in a Human Carcinoma Cell Line. *Photochemistry and photobiology*, 2001, vol. 74, no 1, p. 14-21.

MOGHISSI, K. Role of bronchoscopic photodynamic therapy in lung cancer management. *Current opinion in pulmonary medicine*, 2004, vol. 10, no 4, p. 256-260.

MONTERO, A., et al. Control de síntomas crónicos: Efectos secundarios del tratamiento con Radioterapia y Quimioterapia. *Oncología (Barcelona)*, 2005, vol. 28, no 3, p. 41-50.

MORA, J, et al. Spectroscopic and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [4-(3-N, N-dimethylaminopropoxy) phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, vol. 270, p. 75-84.

MORETTI, M, et al. δ -Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *British journal of cancer*, 2002, vol. 87, no 4, p. 471.

MORTON, C, et al. Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *British Journal of Dermatology*, 2000, vol. 143, no 4, p. 767-772.

MOSER, J, et al. Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers. *Harwood*, 1998.

MUCHA, A, et al. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie*, 2010, vol. 92, no 11, p. 1509-1529.

NAVONE, N, et al. Mouse mammary carcinoma porphobilinogenase and hydroxymethylbilane synthetase. Comparative biochemistry and physiology. *B, Comparative biochemistry*, 1991, vol. 98, no 1, p. 67-71.

NEWELL B.A.T; MEISS R; FINLAYSON C.J. *Patología en esquemas*. Buenos Aires, Argentina: Akadia, 2012. ISBN: 978-9875701946

NINOMIYA, Y, et al. In vitro and in vivo expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives. *Journal of dermatological science*, 2001, vol. 27, no 2, p. 114-120.

ORENSTEIN, A, et al. Photodynamic therapy of cutaneous lymphoma using 5-aminolevulinic acid topical application. *Dermatologic surgery*, 2000, vol. 26, no 8, p. 765-770.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, [consulta: Marzo 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/>

ORTNER, MA, et al. Endoscopic interventions for preneoplastic and neoplastic lesions: mucosectomy, argon plasma coagulation, and photodynamic therapy. *Digestive Diseases*, 2002, vol. 20, no 2, p. 167-172.

OVERHOLT, B, et al. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointestinal endoscopy*, 2005, vol. 62, no 4, p. 488-498.

- PAI, M, et al. Inhibition of in-stent restenosis in rabbit iliac arteries with photodynamic therapy. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2005, vol. 30, no 6, p. 573-581.
- PENG, Q, et al. Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochemistry and photobiology*, 1995, vol. 62, no 5, p. 906-913.
- POLICARD, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la limiere de wood. *Biologie Comptes Rendus*, 1924, vol. 91, p. 1423.
- POTTIER, R, et al. The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1986, vol. 50, no 3, p. 421-452.
- POTTIER, R; KENNEDY, J. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 1990, vol. 8, no 1, p. 1-16.
- PREHN, R; PREHN, L. A new kink in an old theory of carcinogenesis. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2013, vol. 10, no 1, p. 12.
- PRINC, F. *Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata: Estudios sobre la porfobilinogeno-deaminasa. Empleo del ácido delta-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno*. 1995. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- RAAB, O. Über die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z. biol.*, 1900, vol. 39, p. 524-546.
- RHODES, L, et al. Photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate vs surgery for nodular basal cell carcinoma: Results of a multicenter randomized prospective trial. *Archives of dermatology*, 2004, vol. 140, no 1, p. 17-23.
- ROBINSON, D, et al. Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochemistry and photobiology*, 1998, vol. 67, no 1, p. 140-149.
- ROCKSON, S, et al. Photoangioplasty: an emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. *Circulation*, 2000, vol. 102, no 5, p. 591-596.
- ROGERS, L, et al. An efficient synthesis of 5-aminolaevulinic acid (ALA)-containing peptides for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, no 29, p. 6951-6958.
- RUD, E, et al. 5-Aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, vol. 71, no 5, p. 640-647.
- SALAVERRY, O. La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2013, vol. 30, p. 137-141.
- SALIM, A, et al. Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease. *British Journal of Dermatology*, 2003, vol. 148, no 3, p. 539-543.
- SCHOENFELD, N, et al. The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Letters*, 1988, vol 43, p. 43-48
- SCHULLER, D, et al. Photodynamic therapy in head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology*, 1985, vol. 111, no 6, p. 351-355.

SCHULTZ, J; SCHWARTZ, S. The Chemistry of experimental chloroma: II. Isolation of crystalline protoporphyrin, its origin and relation to other porphyrins. *Cancer research*, 1956, vol. 16, no 7, p. 565-568.

SENGE, M, et al. Platelets, photosensitizers, and PDT. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2013, vol. 10, no 1, p. 1-16.

SIBILLE, A, et al. Long-term survival after photodynamic therapy for esophageal cancer. *Gastroenterology*, 1995, vol. 108, no 2, p. 337-344.

SIHVO, E, et al. Fate of patients with adenocarcinoma of the esophagus and the esophagogastric junction: a population-based analysis. *The American journal of gastroenterology*, 2004, vol. 99, no 3, p. 419.

SILVA, P, et al. A New Nonconjugated Naphthalene Derivative of Meso-tetra-(3-hydroxy)-phenyl-porphyrin as a Potential Sensitizer for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2010, vol. 86, no 5, p. 1147-1153.

SINHA, A, et al. Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *British journal of cancer*, 2006, vol. 95, no 4, p. 485.

SIRLIN, Eli. Física de la luz. *Universidad de Buenos Aires*, 2006.

SKYRME, R, et al. A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU international*, 2005, vol. 95, no 9, p. 1206-1210.

SOERGEL, P, et al. Photodynamic diagnosis and therapy in gynecology. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2008, vol. 27, no 4.

SOTO THOMPSON, Marcelo. *Photodynamic therapy utilizing interstitial light delivery combined with spectroscopic methods*. Atomic Physics, Department of Physics, Lund University, 2004.

SPIKES, J.; JORI, G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Lasers in Medical Science*, 1987, vol. 2, no 1, p. 3-15.

STENZL, A, et al. Hexaminolevulinic acid guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *The Journal of urology*, 2010, vol. 184, no 5, p. 1907-1914.

STRAIGHT, R, et al. Porphyrin retention and photodynamic treatment of diet induced atherosclerotic lesions in pigs. *Photodynamic therapy of tumors and other diseases*. Padova, Italy: Libreria Progetto, 1986, p. 350-352.

SZEIMIES, RM. Methyl aminolevulinic acid-photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Dermatologic clinics*, 2007, vol. 25, no 1, p. 89-94.

TAPPEINER H, JODLBAUER A. The sensitising action of fluorescent substance. An overall account of investigations on Photodynamic phenomena. *FCW Vogel*, 1907.

TAUB, A. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 2004, vol. 3, no 1 Suppl, p. S8-25.

TAUB, A. Photodynamic therapy: other uses. *Dermatologic clinics*, 2007, vol. 25, no 1, p. 101-109.

THOMAS, A, et al. Meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) N-confused porphyrin tetrasodium salt: a potential sensitizer for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 2012, vol. 55, no 11, p. 5110-5120.

- TRIESSCHEIJN, M, et al. Photodynamic therapy in oncology. *The oncologist*, 2006, vol. 11, no 9, p. 1034-1044.
- TUNSTALL, RG, et al. Porphyrin accumulation induced by 5-aminolaevulinic acid esters in tumour cells growing in vitro and in vivo. *British journal of cancer*, 2002, vol. 87, no 2, p. 246.
- VALENZENO, D. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochemistry and photobiology*, 1987, vol. 46, no 1, p. 147-160.
- VAN GEMERT, J, et al. Wavelength and light-dose dependence in tumour phototherapy with haematoporphyrin derivative. *British journal of cancer*, 1985, vol. 52, no 1, p. 43.
- VAN STEVENINCK, J, et al. Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochemistry and photobiology*, 1986, vol. 44, no 6, p. 711-716.
- VENA, F, et al. 5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Lasers in medical science*, 2004, vol. 19, no 2, p. 119-126.
- WAIDELICH, R, et al. Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source. *Urology*, 2003, vol. 61, no 2, p. 332-337.
- WAINWRIGHT, M. The use of dyes in modern biomedicine. *Biotechnic & Histochemistry*, 2003, vol. 78, no 3-4, p. 147-155.
- WEIMIN, S, et al. Synthesis and in vitro PDT activity of miscellaneous porphyrins with amino acid and uracil. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2008, vol. 16, no 10, p. 5665-5671.
- WEISHAUPT, K, et al. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research*, 1976, vol. 36, no 7 Part 1, p. 2326-2329.
- WHITAKER, C, et al. Photosensitization of pancreatic tumour cells by delta-aminolaevulinic acid esters. *Anti-cancer drug design*, 2000, vol. 15, no 3, p. 161-170.
- WICKSTRÖM, M, et al. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer science*, 2011, vol. 102, no 3, p. 501-508.
- WIEDMANN, M, et al. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2004, vol. 5, no 4, p. 397-408.
- WILLEMZE, R, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 2005, vol. 105, no 10, p. 3768-3785.
- WILSON, J, et al. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1991, vol. 188, p. 20-25
- WILSON, J, et al. Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1991, vol. 26, no sup188, p. 20-25.
- WOLLINA, U, et al. Multicenter study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2003, vol. 98, no 5, p. 993-1001.
- WOODBURN, K, et al. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochemistry and photobiology*, 1991, vol. 54, no 5, p. 725-732.
- ZEITOUNI, N, et al. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers: current review and update. *Molecular immunology*, 2003, vol. 39, no 17-18, p. 1133-1136.
- ZINZANI, P, et al. Gemcitabine as single agent in pretreated T-cell lymphoma patients: evaluation of the long-term outcome. *Annals of Oncology*, 2009, vol. 21, no 4, p. 860-863.

ZINZANI, P, et al. Gemcitabine treatment in pretreated cutaneous T-cell lymphoma: experience in 44 patients. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, vol. 18, no 13, p. 2603-2606.



HIPÓTESIS GENERAL Y OBJETIVOS

1. Hipótesis general

La hipótesis general de trabajo fue:

- a) Que la modificación de la molécula de pro-fotosensibilizante ALA o su esterificación en macromoléculas permite mejorar la respuesta a la ALA-TFD en modelos de distintas patologías tumorales y en ateromas.
- b) Que el diseño de nuevos fotosensibilizantes porfirínicos catiónicos puede mejorar la eficacia de la TFD en modelos tumorales respecto a los FS ya existentes.

2. Elaboración de la hipótesis

La Terapia Fotodinámica es un tratamiento sumamente efectivo para ciertos tipos tumorales, con un potencial enorme no sólo por sí misma, sino como complemento a las terapias tradicionales. Su eficiencia ha sido comprobada en innumerables ensayos *in vitro* e *in vivo*, tanto en investigación como en ensayos clínicos, y se evidencia sobre todo en la aprobación en aumento constante de drogas fotosensibilizantes para una gran cantidad de patologías.

La búsqueda de mejorar la eficiencia de la TFD involucra el diseño de nuevos FS o la modificación de pro-FS (particularmente para la ALA-TFD), en relación a una mayor eficacia fotodinámica, menor toxicidad *per se* y sobre todo mayor selectividad por el blanco terapéutico. A su vez, se intenta encontrar la aplicación óptima para cada uno de ellos, razón por la cual se evaluarán los mismos en diferentes modelos *in vitro* y algunos modelos *in vivo*, de acuerdo a las características químicas de cada FS o pro-FS.

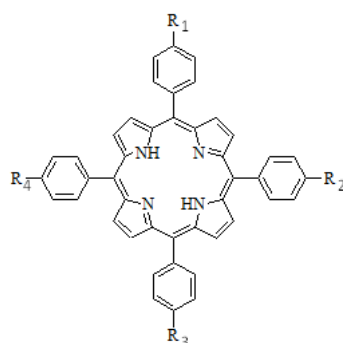
En relación a los FS derivados de porfirinas, los derivados meso sustituidos son interesantes pues poseen características ideales de un buen FS, tales como alta absorptividad, elevada producción de $^1\text{O}_2$, y buen rendimiento cuántico de fluorescencia; lo que permite su uso como agente terapéutico y en la fotodetección tumoral.

Las meso-tetrafenil porfirinas son relativamente sencillas de sintetizar, y de fácil sustitución en el grupo fenilo para modificar la lipofilidad de las mismas. La adición de sustituyentes hidrofóbicos e hidrofílicos en la estructura del FS es capaz de producir un eje de polaridad intramolecular, que puede facilitar la penetración a través de membranas celulares, y producir una mejor acumulación en los compartimentos subcelulares, lo que mejora la fotosensibilización efectiva

(Weitemeyer et al., 1998; Milanesio et al., 2003). Un efecto similar puede ocurrir también con la adición de cargas positivas incorporadas en las posiciones periféricas del FS, sobre todo para la fotoinactivación de microorganismos (Lazzeri et al., 2004). Por otro lado, resulta interesante la incorporación de grupos periféricos con actividades biológicas *per se*, que pudiesen además potenciar el efecto de la fotosensibilización.

A partir de estas premisas es que se desarrollaron 5 nuevos FS derivados de meso-tetrafenilporfirinas, con diferentes sustituyentes en posiciones meso.

Tabla 1: Estructuras químicas, logD y parámetros fisicoquímicos de los nuevos FS basados en porfirinas.



FS	Sustituyente	ϵ_{\max}^a	Φ_F^b	Φ_A^c	LogD ^d	Referencia
TAPP	R _{1,4} : Amino propoxilo	1,64	0,15	0,53	3,5	Mora et al., 2013
A₂B₂	R _{1,3} : trifluorometilo R _{2,4} : amino propoxilo	1,67	0,12	0,4	4,52	Camino et al., 2005
TEMCP	R _{1,4} : grupo carbazólico	2,8	0,13	0,4	4,8	Ferreira et al., 2014
TEMCC		1,24	0,23	0,49	3,94	Ferreira et al., 2014
TCP-C₆₀	R _{1,3,4} : grupo carbazólico R ₄ : pirrolidina-C ₆₀	2,49	0,01	0,02	10,15	Ballatore et al., 2014

^a Coeficiente de absorción molar, en la banda de Soret ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

^b Rendimiento cuántico de fluorescencia

^c Rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)

^d LogD octanol PBS pH 7,4, calculado con el software Calculator Plugins, Marvin 6.3.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

En cuanto al espectro de absorción de las porfirinas sintetizadas, estas muestran bandas de absorción muy intensas en el rango 380-450 nm (banda Soret) con coeficientes de absorción molar del orden de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En relación a otros FS como el Photofrin®, Foscan® y Visudyne® estos son valores entre 10-100 veces mayores. Además, a longitudes de onda en el rango de 500-750 nm, muestran un

conjunto de bandas de absorción más débiles (bandas Q) con coeficientes de extinción molar del orden de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, importantes por estar dentro de la ventana óptica terapéutica. Estas son características de una simetría axial 2dh. A su vez, presentan pequeños corrimientos de Stokes, lo que indica que se producen cambios estructurales menores entre su estado fundamental y el estado excitado, de acuerdo con la estructura plana rígida del macrociclo (Mora et al., 2013). El efecto de presentar sustituyentes simétricos o asimétricos también parecería contribuir a los efectos globales sensibilizantes (Moser et al., 1998; Lazzeri & Durantini, 2003).

La porfirina TAPP es una porfirina del tipo A_4 , que presenta 4 sustituyentes idénticos aminopropoxilo. Los grupos amino periféricos pueden adquirir cargas positivas favoreciendo su interacción con las biomembranas, dependiendo del medio en el cual la porfirina está localizada (Mora et al., 2013). La porfirina A_2B_2 es una trans porfirina, presenta dos tipos de grupos diferentes, aminopropoxilo cargado positivamente (otorgándole una carga global 2+) y el trifluorometilo. La presencia de átomos de flúor en moléculas biológicamente activas puede mejorar su lipofilia y, por lo tanto, su captación y transporte *in vivo*. En particular, el grupo trifluorometilo confiere mayor estabilidad y lipofilicidad además de su alta electronegatividad (Filler et al., 1982; Welch, 1991). Estos grupos en su periferia generan diferentes polaridades en la molécula, lo cual le confiere carácter anfipático (Caminos et al., 2005).

La porfirina TEMCP y su molécula análoga clorina TEMCC presentan 4 grupos carbazólicos idénticos cargados positivamente (dotándolas de una carga global 4+), tiene una forma del tipo A_4 -porfirina. Se ha reportado que muchos compuestos heterocíclicos conteniendo un núcleo carbazólico desarrollan una potente actividad antitumoral (Issa et al., 2010).

La diada porfirina-fullereno (TCP- C_{60}) presenta 3 sustituyentes carbazólicos y uno con unión a la pirrolidina-fullereno, tiene una forma A_3B -porfirina. La metilación de los átomos de nitrógeno de los grupos sustituyentes otorga a la diada una carga global de 4+. Cabe destacar que el fullereno puede actuar como un FS *per se*, pudiendo absorber luz a longitudes de onda de entre 400-505 nm. Se observó un comportamiento interesante en el fullereno C_{60} vinculado a una estructura molecular donadora de electrones, tal como la porfirina (Milanesio et al., 2010). Estas díadas presentan una mayor capacidad para formar un estado de separación de cargas fotoinducidas, fenómeno por el cual una molécula actúa como antena activadora de electrones que luego son cedidos a una molécula receptora cercana (Imahori et al., 2001; Liddell et al., 2004). Estudios previos revelaron que el fullereno C_{60} unido covalentemente a una porfirina sustituida por

grupos metoxi y su complejo metálico con Zn (II) resultaron FS efectivos para destruir la línea celular del carcinoma de laringe humana Hep-2 (Milanesio et al., 2005; Alvarez et al., 2006).

Al comparar los parámetros fisicoquímicos de las 5 porfirinas (Tabla 1), se observa que presentan valores elevados de extinción molar, producción de $^1\text{O}_2$, y rendimiento cuántico de fluorescencia semejantes entre ellas, y comparables a la otras porfirinas ampliamente estudiadas como latetrafenilporfirina (TPP). A su vez, los nuevos FS exhiben menor grado de lipofilicidad al comparar sus logD con otras porfirinas meso sustituidas como la m-THPP (10) o la m-THPC o Foscan® (9), y comparables a los de la PpIX (2,5). Es de destacar, que si bien la diada porfirina-fullereno muestra valores bajos de producción de $^1\text{O}_2$ y rendimiento cuántico de fluorescencia, su fortaleza como FS estaría dada por su capacidad de aprovechar a la porfirina como antena en el rango de luz terapéutica para luego transferir electrones al fullereno y así promover el fotodaño celular dirigido, tal como se mencionó previamente.

Se espera que los nuevos FS al ser testeados en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* develen la utilidad de este tipo de modificaciones en la estructura de las meso porfirinas. El valor agregado sería encontrar un FS que presentase una mayor selectividad tumoral y menor toxicidad *per se*. En este sentido, como primera aproximación a este análisis de nuevas porfirinas se propone el estudio sobre la línea celular tumoral LM3, la cual permite obtener resultados *in vitro* y facilita los estudios *in vivo* en ratones BALB/c, por tratarse de un modelo de trasplante de tumor aloténico.

El empleo de pro-FS derivados del ALA permite especular que el aumento de la lipofilicidad puede dar lugar a una distribución intracelular de ALA más efectiva, así como también inducir una síntesis de porfirinas más eficaz, permitiendo la captación celular por difusión pasiva, ya que la selectividad en el caso del ALA o sus moléculas derivadas, está dada por la regulación diferencial de las enzimas del camino del hemo en el tumor.

A partir de esta premisa, con la introducción de grupos lipofílicos a la estructura molecular del ALA, se pretende mejorar sus propiedades físicas, a fin de lograr una mejor penetración a través de las membranas biológicas, una mejor biodistribución y selectividad por el tumor.

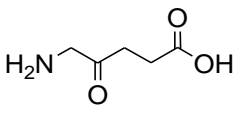
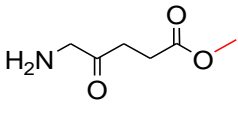
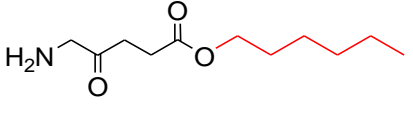
Varias aminopeptidasas han sido señaladas como blanco de terapias antitumorales, siendo específicos de cada estirpe tumoral. Específicamente, las

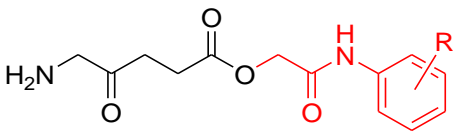
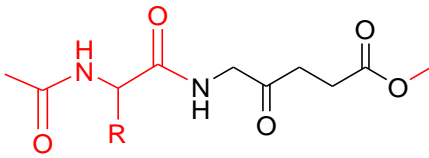
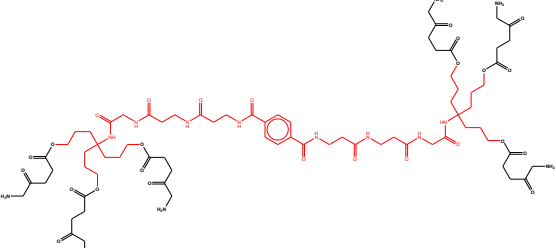
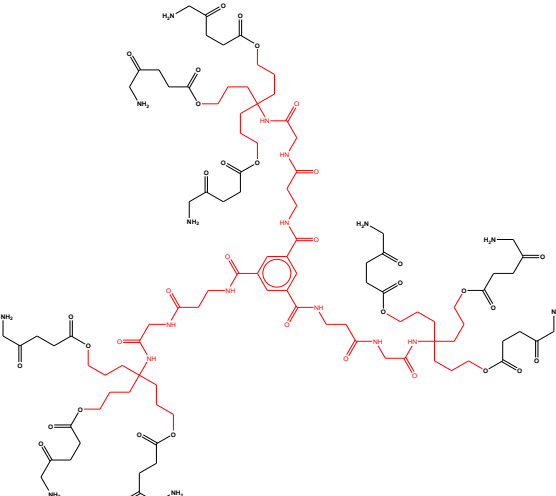
aminopeptidasas N se han asociado con el crecimiento de diferentes cánceres humanos y han sido propuestas como blanco de terapias antitumorales específicas (Wickström et al., 2011). Estas enzimas catalizan la liberación de residuos de aminoácidos neutros localizados en el extremo amino terminal (Berger et al., 2005). De esta manera al utilizar derivados peptídicos de ALA, una vez incorporados por la célula, el ALA puede ser liberado mediante la acción de esterasas y peptidasas citoplasmáticas (Giuntini et al., 2009). A su vez, la CD13/aminopeptidasa N es un importante blanco en la señalización de Ras (Bhagwat et al., 2003).

A lo largo de esta tesis utilizaremos las siguientes estrategias de modificación de las moléculas de ALA con el objetivo de lograr una mejor captación celular como consecuencia de su mayor lipofilidad, y la liberación más eficiente y selectiva de las moléculas de ALA por la acción de enzimas intracelulares tales como peptidasas y esterasas:

- Esterificación del ALA con cadenas alifáticas.
- Conjugación del ALA con amidas sustituidas por medio de una unión éster (conjugados de ALA).
- Unión del ALA con aminoácidos N-acetilados en el extremo amino y además esterificación con un metilo.
- Generación de dendrímeros o polímeros híper-ramificados conteniendo varias moléculas de ALA.

Tabla 2: Estructura y métodos obtención de los diferentes derivados de ALA que se emplearán en esta tesis

ALA 	Comercial (Sigma)
Metil-ALA (éster) 	Comercial (Sigma)
Hexil-ALA (éster) 	Síntesis tradicional de esterificación (Takeya, 1992)

<p>Conjugados de ALA (ésteres)</p>  <p>1f: R= F (posición <i>para</i>) 1g: R= CH₃ (posición <i>para</i>) 1h: R= CF₃ (posición <i>orto</i>) 1i: R= CH₃ (posición <i>orto</i>); Br (posición <i>para</i>) 1k: R= CH₃ (posición <i>orto</i>)</p>	<p>Generados mediante reacciones multicomponentes (Passerini de tres componentes).</p>
<p>Derivados peptídicos</p>  <p>Ac-Leu-ALA-Me: R= leucina Ac-Phe-ALA-Me: R= fenilalanina</p>	<p>Sintetizados a partir de la reacción mixta del éster metílico de ALA con el aminoácido (leucina o fenilalanina) N-acetilado.</p>
<p>Dendrímeros de ALA</p>  <p>6m-ALA: 6 residuos de ALA</p>  <p>9m-ALA: 9 residuos de ALA</p>	<p>La síntesis de dendrímeros pequeños con 6 y 9 residuos de ALA se realizó a partir del método convergente, el cual promueve la generación de estructuras mínimas definidas (dendrones) que luego son ensamblados a un núcleo para conformar los dendrímeros.</p>

A partir de una biblioteca de conjugados de ALA obtenidos por reacciones multicomponentes, se predijo computacionalmente el logD. Debido a que las moléculas pueden adquirir cargas en solución a determinados pHs, se utilizó el logD de los pro-FS como medida de predicción de la solubilidad y penetración a través de las barreras biológicas, como una medida de la lipofilicidad y se la comparó con la del mismo ALA (Tabla 3).

Un valor negativo de logD significa que el compuesto posee más afinidad por la fase acuosa, es decir que es más hidrofílico; cuando logD es igual a 0 significa que el compuesto se encuentra igualmente particionado entre la fase acuosa y la lipídica; mientras que cuando el logD es positivo, denota una mayor afinidad del compuesto por la fase lipídica, es decir que es más lipofílico.

A partir de estos parámetros se seleccionaron, de una serie de conjugados de ALA con logD variables (Gola et al., 2016), 5 compuestos (1f a 1k) de manera de tener un rango de lipofilicidad que va entre -0,45 y 0,69, teniendo en cuenta que el logD del ALA es -3,45, y el de sus derivados comerciales Me-ALA es -1,51 y He-ALA 0,71.

A partir de esta medida, y su comparación con el ALA se observa que los nuevos derivados conjugados del ALA (1f-k) son más lipofílicos que ALA, siendo el 1i similar al He-ALA.

Por otro lado, los derivados peptídicos también resultan más lipofílicos que ALA, siendo el derivado fenilalanínico (Ac-Phe-ALA-Me) marcadamente más lipofílico que en leucínico (Ac-Leu-ALA-Me). En trabajos previos, se determinó el potencial como pro-FS de una serie de derivados peptídicos de ALA utilizando N-(α)-acetil aminoácidos derivados ya que proveen un excelente balance entre lipofilicidad y solubilidad en agua, y se encontraron buenos resultados en la liberación intracelular de ALA y síntesis de porfirinas inducidas en varias líneas celulares (Bourré et al., 2009), por lo cual seleccionamos Ac-Phe-ALA-Me y Ac-Leu-ALA-Me para profundizar los estudios en esta tesis.

Tabla 3: LogD (Coeficiente de partición octanol/PBS pH 7,4) de ALA y sus derivados calculado con el software Calculator Plugins, Marvin 6,3.0, 2014, ChemAxon.

	Pro-FS	LogD
	ALA	-3,45
Éster comercial	Me-ALA	-1,51
Éster sintetizado	He-ALA	0,71
Conjugados de ALA	1f	-0,45
	1g	-0,082
	1h	0,28
	1i	0,69
	1k	-0,082
Derivados peptídicos de ALA	Ac-Leu-ALA-Me	-0,31
	Ac-Phe-ALA-Me	0,09

En cuanto a los derivados dendríticos de ALA, su potencialidad va más allá de la lipofilicidad de los compuestos, y se focaliza principalmente en la alta disponibilidad de moléculas ALA, sin embargo trabajos previos de nuestro grupo demostraron que una alta carga de droga (18 residuos de ALA) puede provocar toxicidad, con lo cual existiría un número máximo de cargas de ALA por unidad portadora (Battah et al., 2007), razón por la cual en esta tesis se evaluaron moléculas con 6 y 9 residuos ALA, con el fin de encontrar el equilibrio adecuado entre mejor respuesta a la TFD con mínima toxicidad del pro-FS. El tamaño de estas moléculas permite hipotetizar sobre su uso en otras aplicaciones de la fotosensibilización, tales como la fotoangioplastia.

Luego de este análisis preliminar, se testearán los nuevos derivados de ALA en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*, con el fin de analizar el impacto de las modificaciones realizadas sobre la síntesis de porfirinas y eficiencia fotodinámica, esperando una mejora con respecto al ALA.

Es así que, utilizando ALA siempre como control de referencia, se realizaron las siguientes consideraciones:

*Sabido por estudios preliminares que los derivados conjugados con amidas sustituidas eran moléculas efectivas en el tratamiento fotodinámico de un adenocarcinoma mamario murino LM2 (Gola et al, 2016), y teniendo en cuenta que la TFD tiene una particular relevancia en las patologías cutáneas, se hipotetizó que podría encontrarse un uso promisorio de estos nuevos pro-FS en una patología poco estudiada en esta terapia como son los linfomas cutáneos de células T

(LCCT), proponiendo para ello un modelo *in vitro* de Micosis Fungoide y Síndrome de Sézary.

* Conociendo la acción de enzimas celulares posiblemente exacerbadas en tumores (peptidasas y esterasas), es que se propone el uso de derivados con aminoácidos en el extremo amino del ALA que favorezcan el ingreso a las células y luego sean fácilmente clivados; es por ello que se hipotetiza la existencia de una respuesta diferencial entre células no tumorales y tumorales. Para el estudio de los derivados peptídicos de ALA se propone el uso del par PAM212/PAM212-Ras de queratinocitos murinos, como modelo de par no tumoral/tumoral. A continuación, con el fin de estudiar la actividad de los derivados peptídicos en un escenario biológico, se propone evaluar los mismos compuestos *in vivo*, empleando un modelo de tumor subcutáneo, y diferentes vías de administración, esperando encontrar una mejor opción de pro-FS con selectividad tumoral e identificar posibles órganos blanco para la TFD.

* Por último, se propone el estudio de macromoléculas que poseen en su estructura varias moléculas de ALA unidas por uniones ésteres, y se hipotetiza su posible factibilidad de aplicación en dos patologías. En primer lugar, se evaluará el beneficio que puede significar la alta disponibilidad de moléculas de ALA presente en una única estructura para su utilización en la terapia contra el cáncer utilizando como modelos *in vitro* las células de adenocarcinoma mamario murino LM2 e *in vivo* la implantación de las mismas de manera subcutánea en ratones BALB/c. En segundo lugar, la posibilidad de utilizar estas moléculas en el tratamiento de ateromas, considerando su gran tamaño y suponiendo que esto produce una selectividad para células macrofágicas, utilizando para este modelo de placa ateromatosa *in vitro*, las células RAW264.7 como modelo de macrófagos, y las HMEC-1 como modelo de células endoteliales.

3. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue el de generar nuevas alternativas para mejorar la TFD a partir del diseño y evaluación de nuevos FS y pro-FS, que aumenten la eficacia y selectividad tumoral; así como también permitan impactar en nuevos blancos celulares en diferentes patologías, aumentando los alcances de la TFD.

4. Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar una serie de nuevos FS basadas en meso-fenil porfirinas

*Estudiar su incorporación en células tumorales tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*.

* Evaluar la eficiencia de los FS. Identificar los sitios de localización subcelular. Analizar los mecanismos de adhesión y/o entrada a la célula.

* Evaluar la biodistribución y selectividad por el tejido tumoral *in vivo*.

2. Sintetizar y caracterizar una serie de nuevos derivados de ALA con mayor lipofilicidad que la molécula parental: derivados ésteres alifáticos, derivados esterificados con amidas sustituidas (conjugados de ALA) y derivados de ALA que adicionan un aminoácido en el extremo amino (derivados peptídicos).

*Estudiar su incorporación en células tumorales tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*.

*Cuantificar su eficiencia fotodinámica *in vitro* e *in vivo*.

3. Sintetizar y estudiar estructuras dendriméricas de ALA conteniendo 6 ó 9 residuos.

*Estudiar su eficiencia de fotoactividad *in vitro* y en la producción de porfirinas *in vivo* en células tumorales.

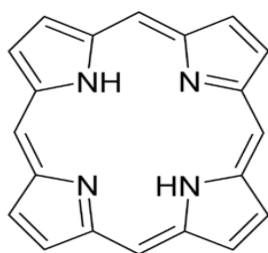
* Estudiar su selectividad por el componente macrofágico de la placa ateromatosa en modelos *in vitro*.

4. Identificar nuevas aplicaciones de la TFD que puedan ser extrapoladas a aplicaciones clínicas, basándonos en los resultados obtenidos.

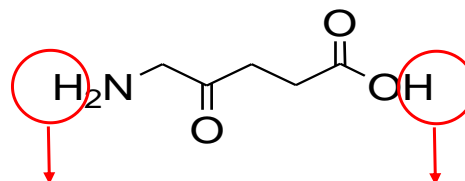
Para llevar a cabo los objetivos, se elaboró el siguiente esquema de trabajo:

Esquema de trabajo

Porfirina (FS)



ALA (pro-FS)



Se reemplaza un H, por un aminoácido N-acetilado (derivados peptídicos).

Se reemplaza el H, para formar ésteres con cadenas alifáticas (He-ALA y Me-ALA) amidas sustituidas (conjugados) y dendrones (unidades mínimas de los dendrímeros).

FS/pro-FS	
Porfirinas 	Modelo tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (BALB/c) LM3 vía tópica.
Conjugados de ALA 	Modelo LCCT <i>in vitro</i> . Myla (MF) y Hut 78 (SS).
Derivados peptídicos de ALA 	Modelo no tumoral/ tumoral <i>in vitro</i> PAM212/PAM212-Ras. Modelo tumoral <i>in vivo</i> (BALB/c) LM2 vía tópica y sistémica.
Dendrímeros <p>N = núcleo L = (espaciador) D (dendron) = 3 residuos de ALA</p>	Modelo tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (BALB/c) LM3 vía topica. Modelo placa ateromatosa RAW264.7 (macrófagos) y HMEC-1 (células endoteliales)

5. Referencias

- WEITEMEYER, A, et al. Photodynamic Tumor Therapy: Second and Third Generation Photosensitizers. *Harwood, New Delhi*, 1998, p. 87.
- MILANESIO, E, et al. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2003, vol. 2, no 9, p. 926-933.
- LAZZERI, D, et al. Photodynamic Studies and Photoinactivation of Escherichia coli Using meso-Substituted Cationic Porphyrin Derivatives with Asymmetric Charge Distribution¶. *Photochemistry and photobiology*, 2004, vol. 80, no 2, p. 286-293.
- MORA, J, et al. Spectroscopic and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [4-(3-N, N-dimethylaminopropoxy) phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, vol. 270, p. 75-84.
- MOSER, J, et al. Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers. *Harwood*, 1998.
- LAZZERI, D; DURANTINI, E. Synthesis of meso-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. *Arkivoc*, 2003, vol. 10, p. 227-239.
- FILLER, R. et al. Fluorine in biomedical chemistry. An overview of recent advances and selected topics. *Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry. New York: Elsevier*, 1982, p. 1.
- WELCH, J. *Selective fluorination in organic and bioorganic chemistry*. American Chemical Society, 1991.
- CAMINOS, D, et al. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, no 05, p. 334-342.
- ISSA, S, et al. Synthesis and antiproliferative activity of oxazinocarbazole and N, N-bis (carbazolylmethyl) amine derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 2010, vol. 45, no 6, p. 2567-2577.
- MILANESIO, E, et al. Methoxyphenyl porphyrin derivatives as phototherapeutic agents. *Current Bioactive Compounds*, 2010, vol. 6, no 2, p. 97-105.
- IMAHORI, H, et al. Solvent dependence of charge separation and charge recombination rates in porphyrin– fullerene dyad. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001, vol. 105, no 2, p. 325-332.
- LIDDELL, P, et al. Photonic switching of photoinduced electron transfer in a dihydropyrene– porphyrin– fullerene molecular triad. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, vol. 126, no 15, p. 4803-4811.
- MILANESIO, E, et al. Porphyrin-fullerene C60 Dyads with High Ability to Form Photoinduced Charge-separated State as Novel Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2005, vol. 81, no 4, p. 891-897.
- ALVAREZ, G, et al. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 12, p. 2092-2101.
- WICKSTRÖM, M, et al. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer science*, 2011, vol. 102, no 3, p. 501-508.

- BERGER, Y, et al. Determination of intracellular prolyl/glycyl proteases in intact living human cells and protoporphyrin IX production as a reporter system. *Chemistry & biology*, 2005, vol. 12, no 8, p. 867-872.
- GIUNTINI, F, et al. Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolism. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, vol. 52, no 13, p. 4026-4037.
- BHAGWAT, S, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*, 2003, vol. 101, no 5, p. 1818-1826.
- FERREYRA, D, et al. Synthesis and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [3-(N-ethyl-N-methylcarbazoyl)] chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, vol. 282, p. 16-24.
- BALLATORE, MB, et al. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin–fullerene C60 dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *European journal of medicinal chemistry*, 2014, vol. 83, p. 685-694.
- TAKEYA, H. Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl esters as herbicides. En *Chem. Abstr.* 1992. p.116.
- GOLA, G, et al. Synthesis of chemically diverse esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy via the multicomponent Passerini reaction. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no 92, p. 89492-89498.
- BOURRÉ, L, et al. Protoporphyrin IX enhancement by 5-aminolaevulinic acid peptide derivatives and the effect of RNA silencing on intracellular metabolism. *British journal of cancer*, 2009, vol. 100, no 5, p. 723.
- BATTAH, S, et al. Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Molecular cancer therapeutics*, 2007, vol. 6, no 3, p. 876-885.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y solventes

ALA y Me-ALA (Figura 1) se adquirieron de Sigma Chem Co., St. Louis, MO, EE.UU. Las soluciones se prepararon en agua bidestilada salvo indicación de uso de solventes adicionales, los medios de cultivo en agua bidestilada y deionizada. Todos los otros solventes o reactivos químicos fueron de grado analítico.

2. Síntesis de derivados de ALA

2.1 Derivados ésteres de ALA

El He-ALA (Figura 1) se sintetizó de acuerdo al método de Takeya (1992) mediante la reacción de ALA con el alcohol alifático hexanol en presencia de cloruro de tionilo dando el compuesto como la sal de hidrocloreto (HCl), confirmando la reacción por RMNTLC ($\text{Cl}_2\text{CH}_3/\text{MeOH}$ 9:1). La mezcla se llevó a 70°C hasta que el ALA.HCl se disolvió completamente, El exceso de alcohol fue evaporado en rotavapor con bomba de alto vacío. Luego se adicionó dietiléter, y las sales de los derivados de ALA.HCl cristalizaron a 4°C. El rendimiento fue del 60%. La pureza del compuesto sintetizado fue siempre superior al 95%, establecido por las técnicas de TLC y RMN. Las soluciones se prepararon en agua bidestilada.

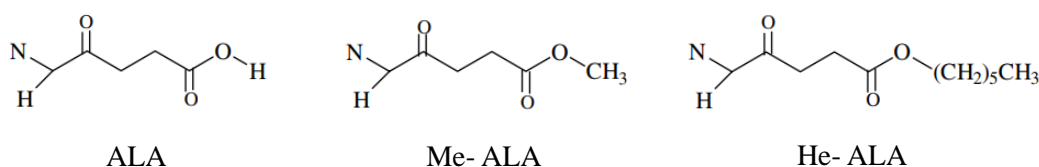


Figura 1. Estructura química del ALA, Me-ALA y el He-ALA

2.2 Derivados conjugados de ALA

Los nuevos derivados conjugados con amidas sustituidas por medio de una unión éster de ALA, 1f, 1g, 1h, 1i y 1k (Figura 2) fueron sintetizados en colaboración con el grupo del Dr Javier A. Ramírez en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR-CONICET) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. La síntesis se basó en las reacciones multicomponentes, en particular la reacción de Passerini de tres componentes (P-

3CR). En primer lugar, se protege el grupo amino del ALA dando lugar al derivado carboxibenciloxi amino, dejando el grupo ácido libre para reaccionar en la P-3CR. Paralelamente reacciona con diferentes isocianidas y un exceso de formaldehído, lo que da lugar a la serie de compuestos, que luego se desprotegen para finalizar el proceso de síntesis. Esta estrategia sintética permite generar de manera simple y rápida nuevas prodrogas de ALA con gran diversidad estructural (Gola et al., 2016).

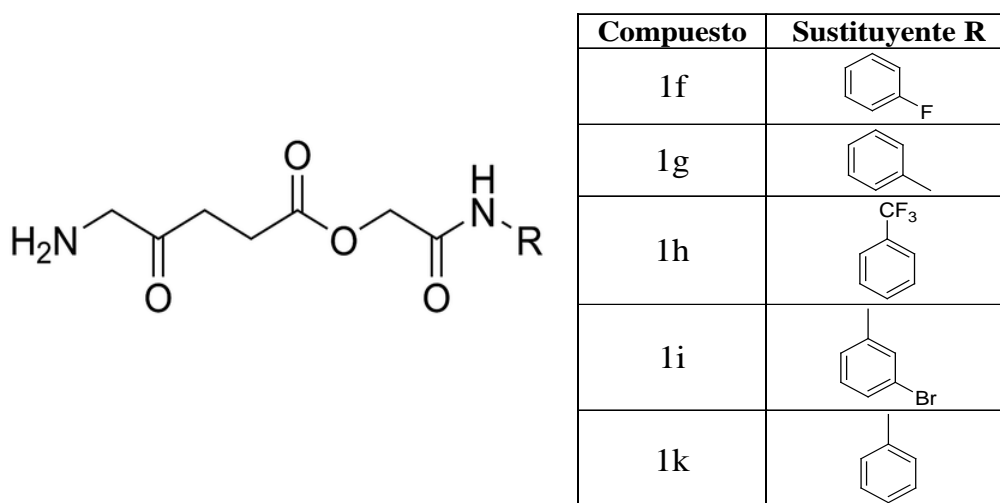
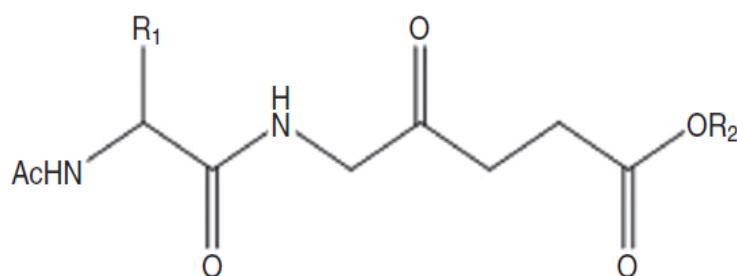


Figura 2. Estructura química de los nuevos derivados ésteres derivados de ALA.

2.3 Derivados peptídicos de ALA

En los llamados “derivados peptídicos” la molécula del ALA se encuentra esterificada en su extremo carboxilo con un metilo, y el extremo amino se encuentra sustituido con un aminoácido acetilado en su extremo N-terminal. Se emplearon los derivados Ac-Leu-ALA-Me y Ac-Phe-ALA-Me (Figura 3), en los cuales se adicionaron moléculas de Leucina y de Fenilalanina respectivamente. Los mismos fueron sintetizados en colaboración con el grupo del Dr Eggleston del Departamento de Farmacia y Farmacología, Universidad de Bath, Reino Unido, siguiendo la metodología descrita por Rogers et al. (2005) y Giuntini et al. (2009). La conjugación entre un aminoácidos y el ALA se realizó mediante la reacción de la sal de hidrocloreuro de ALA y protegiendo el aminoácido con uretano, utilizando concentraciones equimolares de ambos compuestos, de manera de producir la reacción de acoplamiento simultáneamente al desproteger el aminoácido y agregar un grupo acilo al ALA, utilizando THF y una base (N,N-Diisopropiletilamina).



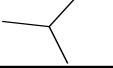
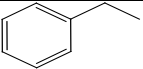
Compuesto	Sustituyente R1	Sustituyente R2
Ac-Leu-ALA-Me		CH ₃
Ac-Phe-ALA-Me		

Figura 3. Estructura química de los derivados peptídicos de ALA.

2.4 Síntesis de dendrímeros de ALA

Las síntesis de los dendrímeros 6m-ALA y 9m-ALA se llevó a cabo por el grupo de la Dra Battah de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Essex, Reino Unido. Se utilizó la metodología de síntesis convergente o paso a paso, la cual es capaz de dar una estructura definida, monodispersa y unimolecular (Battah et al., 2001). El dendrímero se ensambló por segmentos: primero se sintetizaron los bloques individuales o dendrones, y luego fueron agregados a un núcleo aromático múltipodo con brazos espaciadores. Las ramas del dendrímero se forman a partir de la unión de los dendrones a esta estructura. El dendrímero 6m-ALA: contiene dos espaciadores de longitud $n = 3$, que portan un dendrón cada uno, dando lugar a 6 residuos de ALA. El dendrímero 9m-ALA contiene tres espaciadores de longitud $n = 2$, que portan un dendrón cada uno, dando un total de 9 residuos de ALA (Figura 4).

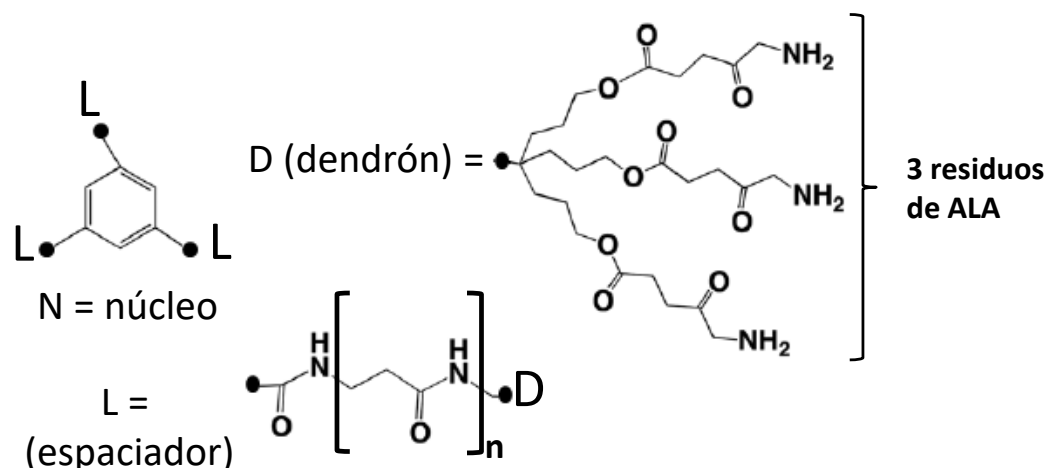


Figura 4. Estructura química de los dendrímeros de ALA.

Las soluciones de todos los derivados de ALA se prepararon inmediatamente antes de su uso; en agua bidestilada, para los experimentos *in vitro* y en solución salina, para experimentos *in vivo*.

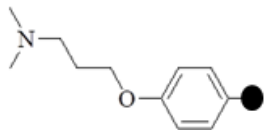
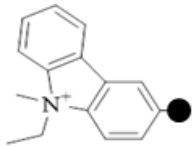
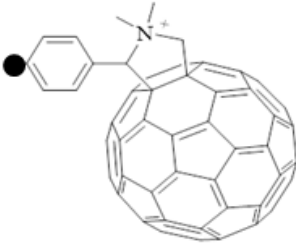
2.5 Predicciones de logD

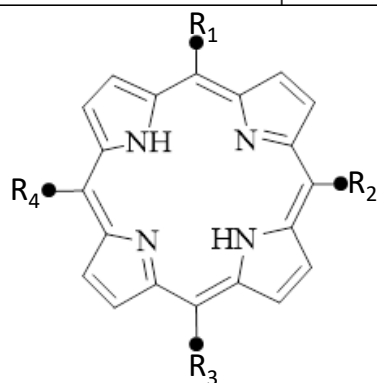
El coeficiente de distribución octanol/PBS pH 7,4 (logD) determina el grado de lipofilicidad de una molécula; para su determinación se realizó la predicción teórica mediante Calculator Plugins, Marvin 6.3.0, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

3. Síntesis de nuevos FS

Se utilizaron las siguientes meso porfirinas sintéticas (Figura 5 y Tabla 1): 5,10,15,20- tetrakis[4-(3-N,N- dimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP) (Caminos et al., 2005), 5,15-di(4-[3-N,Ndimetilaminopropoxi]fenil)-10,20-di(4-trifluorometilfenil) porfirina (A2B2) (Caminos et al., 2005), 5,10,15,20-tetrakis[3-(N-etil-N-metilcarbazoil)] clorina (TEMCC) y su porfirina análoga (TEMCP) (Ferreyra et al., 2014), y la carbazoil porfirina unida a un fullereno C₆₀ (TCP-C₆₀) (Ballatore et al., 2014).

La síntesis de estos compuestos fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Durantini en el Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, de Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba.

Compuesto	Meso sustituyente	
TAPP	R_{1-4}	
		
TCP-C ₆₀	$R_{1,3,4}$	R_2
		



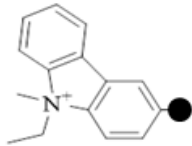
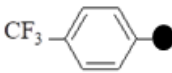
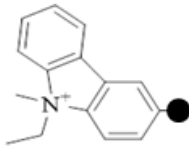
Compuesto	Meso sustituyente	
TEMCP	R_{1-4}	
TEMCC Clorina		
A ₂ B ₂	R_{1y3}	R_{2y4}
		

Figura 5. Estructura química de las porfirinas sintéticas. Los FS mostraron la típica banda de Soret a 420 nm y las cuatro bandas Q entre 515 y 650 nm.

Tabla 1. Propiedades espectroscópicas y fisicoquímicas de las porfirinas empleadas disueltas en DMF

FS	ϵ_{\max}^a	Φ_F^b	Φ_A^c	λ_{ex}^d	λ_{em}^e	Referencia
TAPP	1,64	0,15	0,53	421	659	Mora et al., 2013
A ₂ B ₂	1,67	0,12	0,4	418	652	Caminos et al., 2005
TCP-C ₆₀	2,49	0,01	0,02	432	664	Ballatore et al., 2014
TEMCC	1,24	0,23	0,49	430	655	Ferreya et al., 2014
TEMCP	2,8	0,13	0,4	430	660	Ferreya et al., 2014

^a Coeficiente de absorción molar, en la banda de Soret ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

^b Rendimiento cuántico de fluorescencia

^c Rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)

^d Longitud de onda de excitación máximos

^e Longitud de onda de emisión máximos

Las soluciones de los compuestos fueron guardadas a -70°C protegidas de la luz. Las soluciones stock fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), realizándose soluciones adicionales de trabajo en PBS para las células y solución fisiológica para la administración sistémica, conteniendo una concentración final de 0,1% de DMSO *in vitro* y 10% *in vivo* tanto para ensayos tópicos como sistémicos. Dichas concentraciones no provocan toxicidad tanto en ensayos *in vitro* (Leila et al., 2016) como *in vivo* (Workman et al., 2010). Las soluciones stock al igual que las soluciones de trabajo en células se sonicaron previamente a su utilización para lograr una suspensión homogénea.

4. Líneas celulares

Para los cultivos celulares se empleó medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Life Technologies) con rojo fenol y bicarbonato 2 g/l. A su vez, se lo suplementó con L-glutamina 2 mM (Cicarelli, Argentina), gentamicina 40 $\mu\text{g/ml}$ (Amoxigen, Bayer, Argentina) y suero fetal bobino (SFB) 5-15% (Natocor, Argentina) según la línea celular.

PAM212 y PAM212-Ras: PAM212 es una línea celular inmortalizada y espontáneamente transformada de un cultivo de queratinocitos primarios de un ratón BALB/c. Se cultiva en medio suplementado con 5% de SFB. La línea PAM212-Ras es una línea derivada de la PAM212, transfectada establemente con

el oncogén Ras según Espada et al, (2009). Los controles para la presencia de Ras se llevaron a cabo periódicamente mediante ensayos de Western Blot. Después de 7 días de cultivo en presencia de G418 (Calbiochem, Merck), las células transfectadas se cultivaron rutinariamente en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB,

RAW 264,7: Es una línea de macrófagos murinos provenientes de la ATCC. Se cultiva en medio suplementado con 10% de SFB.

LM3 y LM2: Son líneas celulares provenientes de los adenocarcinomas mamarios murinos surgidos espontáneamente (M2 y M3) en un ratón BALB/c, cedida por el Instituto Angel Roffo (Urtreger et al., 1997; Werbajh et al., 1998 Galli et al., 2000). Se cultiva en medio suplementado con 5% de SFB.

HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell line-1): Son células endoteliales humanas (Ades et al., 1992), provistas por Dr E.W. Ades (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Estas células fueron inmortalizadas por transfección con un plásmido conteniendo el antígeno T del SV40A. Se cultivan en medio suplementado con 15% de SFB y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (1 ng/ml).

Todas las líneas celulares adherentes fueron crecidas a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, Fueron utilizadas 48 h luego de sembradas en placas de cultivo (5 x10⁴ células/ml).

Myla y Hut78: Son líneas de linfocitos CD3+, CD4+, CD45Ro+, de Linfomas Cutáneos de Células T (LCCT), cedidas por la Dra Vibeke Pless, de Bispebjerg Hospital, Copenhague, Dinamarca. La línea MyLa, proviene de una placa de un paciente con Micosis Fungoide (MF), en tanto que la línea Hut78 es derivada de pacientes con Síndrome de Sezary (SS). Ambas líneas utilizan el medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, y se repican por dilución en medio fresco. Los ensayos se realizan en el día de siembra con las células en estado metabólicamente activo (3 x10⁵ células/ml).

5. Determinación del número de células

El número de células sembradas por pocillo y el número de células empleado en la relativización de los valores de fluorescencia intracelular se determinó por conteo

de células viables, incubadas en presencia del colorante vital de exclusión azul Tripán.

6. Exposición de células a ALA, derivados de ALA, dendrímeros y FS

Para los ensayos con cultivos celulares adherentes, a las células obtenidas luego de un período de crecimiento de 48 h, se les quitó el medio de cultivo y se las lavó con medio fresco. Las células se incubaron en medio sin SFB conteniendo diferentes concentraciones de ALA, derivados de ALA o FS según el ensayo. Las condiciones de incubación fueron a 37° C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂.

Para los ensayos con las líneas no adherentes (Myla y Hut78), las células se sembraron el mismo día del experimento, proviniendo de cultivos metabólicamente activos, a los cuales se le adicionó el compuesto a analizar.

Los controles corresponden a las células incubadas en presencia del solvente de dilución.

7. Extracción de porfirinas intracelulares sintetizadas *in vitro* a partir de ALA, derivados de ALA o dendrímeros

Luego del período de incubación de las células con ALA, derivados de ALA o dendrímeros se agregaron 2 ml de HCl 5% para lograr la extracción de las porfirinas sintetizadas endógenamente. La cuantificación de las mismas se llevó a cabo mediante un fluorómetro Perkin Elmer LS55 registrando la fluorescencia emitida por las porfirinas utilizando una longitud de onda de excitación de 406 nm y de emisión de 604 nm. Se utilizó como estándar de referencia una solución de PpIX comercial (Porphyrin Products, Logan, Utah, EE.UU.). Los controles correspondieron a células expuestas al vehículo.

8. Extracción de los nuevos FS incorporados a las células

Los tiempos de exposición al FS se fijaron de manera tal de obtener una fluorescencia intracelular de al menos 3 veces mayor que los valores basales de autofluorescencia, obteniendo como tiempo óptimo 3 h. Las concentraciones máximas empleadas se determinaron en función de aquéllas que no mostraron citotoxicidad en oscuridad, en ensayos de viabilidad por MTT.

Los FS se extrajeron de las células con 2 ml de DMSO luego de 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS). La fluorescencia obtenida se cuantificó en un fluorómetro Perkin Elmer LS55 empleando las longitudes de onda de luz de máxima excitación y emisión para cada FS (Tabla 1) y la cuantificación de FS se realizó empleando curvas estándar de cada FS disuelto en 1% DMSO en PBS. Los controles correspondieron a las células expuestas al solvente de dilución.

9. Tratamiento de TFD *in vitro*

Las células se incubaron en medio sin SFB con los pro-FS o FS, y seguidamente se lavaron con medio sin SFB para eliminar los restos de FS o pro-FS no incorporado. A continuación, se irradiaron a diferentes tiempos con un banco de tubos fluorescentes (Figura 6) y se reemplazó el medio sin suero por medio completo. En el caso de células de crecimiento en suspensión, los lavados y cambios de medio se realizaron mediante centrifugación a 350 g. Las células permanecieron 19 h a 37°C para permitir que ocurra el fotodaño. Pasado este tiempo, se cuantificó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. Se define la dosis letal 50 (DL₅₀) como la dosis de luz (en mJ/cm²) que produce el 50% de muerte celular.

Los controles de este ensayo corresponden a: 1) células sin tratamiento alguno 2) células sin tratar con FS o pro-FS e irradiadas, 3) células expuestas a los FS o pro-FS sin irradiación.

10. Fuente de luz

Se utilizó un banco de dos tubos fluorescentes (Osram L 36 W/10) que produce un espectro de luz entre 400 y 700 nm con la radiación máxima a 600 nm. Las placas

se ubicaron sobre una lámina de vidrio a 20 cm de la fuente lumínica (Figura 6). La potencia de luz emitida se midió con un radiómetro Laser Mate-Q, Coherent (EE.UU.). Se utilizaron potencias entre 5 y 250 mJ/cm² y la densidad de potencia fue de 0,5 mW/cm².

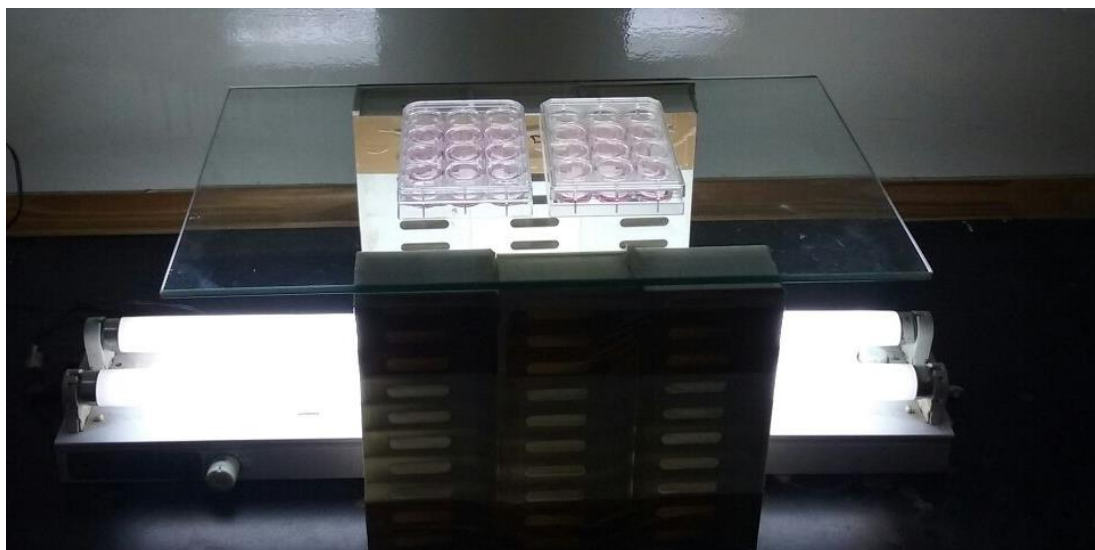


Figura 6. Banco de irradiación de tubos fluorescentes.

11. Ensayo de viabilidad de MTT

La fototoxicidad y toxicidad celular fueron determinadas mediante el ensayo de MTT (3-(4,5- dimetil tiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliobromuro) (Denizot y Lang, 1986), método basado en la actividad de las dehidrogenasas mitocondriales, la cual se ha demostrado que correlaciona bien con otras medidas de citotoxicidad, como por ejemplo, el ensayo clonogénico o de formación de colonias (Evans et al., 1997, Kawada et al., 2002). Luego de los tratamientos, se agregó en cada pocillo 0,5 mg/ml de MTT y las placas se incubaron a 37° C por 1 h. Como resultado se obtuvieron cristales de formazán, que se disolvieron en DMSO y se leyó la absorbancia de la solución obtenida a 560 nm en un lector automático de placas (Spectra Count Packard, EE.UU.). En el caso de células de crecimiento en suspensión, los cristales de formazán se resuspendieron en DMSO luego de centrifugación a 1000 g.

12. Determinación de transporte celular de dendrímeros y FS

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar el transporte principal por el cual son captados los nuevos FS y los dendrímeros de ALA.

12.1 Mecanismos de difusión pasiva y transporte activo de TAPP

Para discriminar la dependencia de la energía en el transporte celular de la porfirina TAPP, se estudió la incorporación y el efecto fotodinámico a temperatura diferencial, aprovechando el fenómeno que a 4°C los transportes dependientes de energía se encuentran disminuidos mientras que el transporte pasivo no se encuentra mayoritariamente afectado (Smith y Morgan, 1981; Harding et al., 1983). A partir de ello, se incubaron las células con los compuestos a 4°C o 37°C durante 90 min para permitir la entrada de TAPP a la célula en un lapso de tiempo que la temperatura baja no afecte su viabilidad. Seguidamente, se cuantificaron las porfirinas intracelulares mediante fluorescencia, y para corroborar los resultados, se realizó el tratamiento fotodinámico y se cuantificó el grado de daño celular como medida indirecta de la entrada de TAPP a la célula.

12.2 Endocitosis

12.2.1 Inhibición de fusión endosoma-lisosoma

También se estudió el fenómeno de endocitosis de dendrímeros de ALA y de la porfirina TAPP. Se conoce que el transporte entre endosomas y lisosomas se encuentra bloqueado a 18°C (van Deurs et al., 1987; Dunn et al., 1980). Razón por la cual se incubaron las células a dicha temperatura por 3 h, comparando luego la cantidad de porfirinas intracelulares sintetizadas a partir de los dendrímeros o bien la TAPP que ingresó a la célula en comparación con el proceso llevado a cabo a 37°C.

12.2.2 Inhibidores de la endocitosis

Estos ensayos se realizaron para determinar el grado de incorporación por endocitosis de los dendrímeros de ALA en las células de macrófagos RAW 264,7.

Las células se expusieron a los inhibidores de endocitosis de la siguiente manera: 1 min para N-etilmaleimida (NEM) 0,1 mM, 60 min para 10 µg/ml de nistatina, 30 min para 10 µg/ml de amilorida y 30 min para clorpromazina 0,5 µg/ml. A

continuación, se retiraron los compuestos y las células se lavaron y se incubaron durante 3 h con ALA o sus dendrímeros en una concentración de 0,3 mM, luego se extrajeron y cuantificaron las porfirinas sintetizadas.

13. Localización subcelular de TAPP

Este ensayo se realizó para determinar la ubicación intracelular de TAPP, uno de los nuevos FS porfirínicos.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos; 48 h después se incubaron con TAPP durante 30 min, y luego con las sondas fluorescentes. Para ello se empleó una concentración de 2,5 μM de TAPP y se utilizaron sondas fluorescentes específicas de organelas; LysoTracker Green para lisosomas (0,1 μM), Mito Tracker Green para mitocondrias (0,1 μM), y NBD C6-Ceramida para Aparato de Golgi (5 μM).

La observación y adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio Olympus BX51 empleando los correspondientes filtros para microscopía de fluorescencia: azul (450-490 nm, filtro de excitación BP 490) y verde (545 nm, filtro de excitación BP 545). La fluorescencia de TAPP se registró en el canal rojo y la de las sondas en el canal verde. Para el procesamiento y análisis de las mismas se utilizó el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto Fiji, basado en ImageJ (desarrollado en National Institutes of Health, EE.UU.).

14. Animales

Se utilizaron como modelo de tumor subcutáneo los adenocarcinomas mamarios murinos LM3 y LM2 (Instituto Angel Roffo) implantados subcutáneamente en el flanco derecho de ratones machos BALB/c, Ambas líneas fueron originadas en esta cepa de ratón, por lo cual, se trata de un modelo alogénico y no es necesaria la complejidad de utilizar ratones atímicos. Los animales se implantaron a las 12 semanas de vida, pesando entre 20-25 g, y fueron alimentados con dieta Purina 3 (Molinos Río de la Plata) y agua *ad libitum*.

Se le inyectó una suspensión de $1,6 \times 10^5$ células de la línea LM3 o LM2 subcutáneamente en el flanco de los ratones. Los experimentos se realizaron 20

días después de la implantación, tiempo aproximado al cual los tumores llegaron a un tamaño uniforme de 1 cm diámetro.

Los animales recibieron atención y los protocolos empleados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires) en total concordancia con la Guía Británica para el buen cuidado de animales en neoplasia experimental (Workman et al., 2010).

15. Administración de pro-FS y FS en animales

Para la administración tópica (Figura 7A), se rasuró la zona peritumoral, y se aplicaron el ALA, sus derivados o dendrímeros o los FS sobre la piel adyacente al tumor (PAT), mediante el uso de un pincel suave por un período de 5 min, tiempo en el cual ya no se observan vestigios de las soluciones. Los pro-FS se disolvieron en 0,2 ml de solución fisiológica, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de los FS se prepararon en 0,2 ml de solución fisiológica conteniendo 10% DMSO. Esta cantidad fue aplicada sobre la PAT en tumores uniformes de 1 cm de diámetro.

Al área de aplicación se la denominó piel adyacente al tumor (PAT), en tanto que la piel distante fue tomada del flanco opuesto, también rasurada para tal fin (Figura 7A).

Para la administración sistémica, ALA, los diferentes derivados de ALA y dendrímeros se disolvieron en solución fisiológica, y los FS en solución fisiológica conteniendo 10% de DMSO en un volumen final de 0,15 ml, inmediatamente antes de la inyección intraperitoneal (i.p.) (Figura 7B).

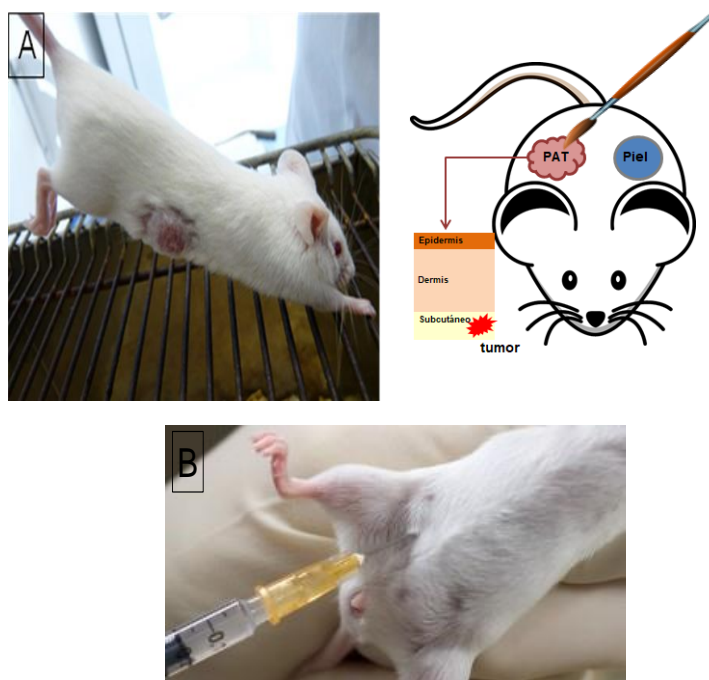
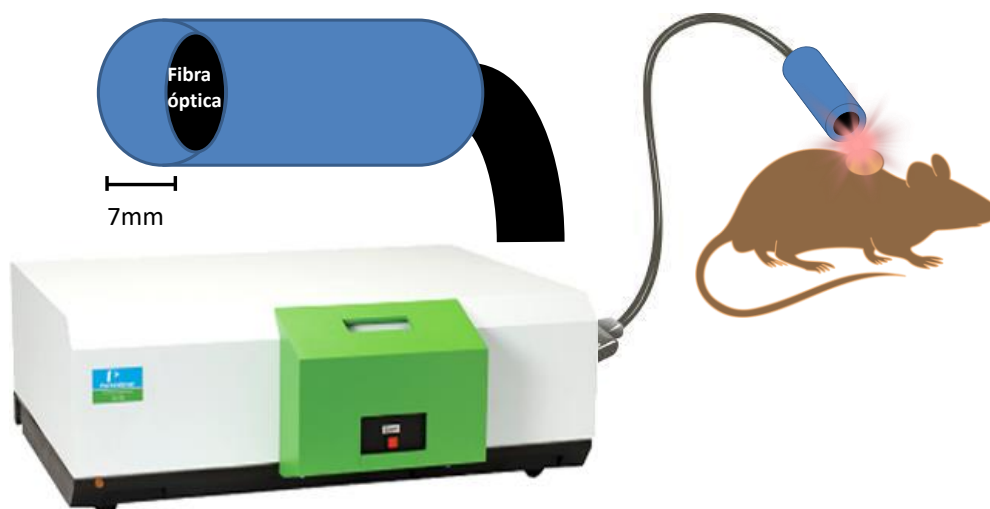


Figura 7. Vías de aplicación tópica (A) y sistémica (B)

16. Espectroscopía de fluorescencia para cuantificación de porfirinas en la piel de ratón

Se realizaron mediciones de fluorescencia *in vivo* para seguir la cinética de formación de porfirinas luego de la aplicación tópica de ALA, los derivados de ALA o dendrímeros. También se utilizó para el seguimiento del nuevo FS, TAPP. Se acopló una fibra óptica a un fluorómetro Perkin Elmer LS55 (Figura 8), la cual se colocó sobre la piel del animal (PAT y piel distante). Las longitudes de onda de excitación-emisión que se emplearon para porfirinas a partir de ALA y TAPP fueron de 407-635 nm y 420-660 nm, respectivamente. Considerando el coeficiente de atenuación para la piel, la luz de 407 o 420 nm penetra lo suficientemente como para recoger la emisión de la epidermis y la dermis (Van den Akker et al., 2002), de manera que la fluorescencia que se recogió pertenece a estas estructuras. La fibra se fijó a la piel con un espaciador de goma que provee una distancia entre la fibra y el tejido, constante y fija de 7 mm. Estas condiciones proporcionan una señal máxima de fluorescencia para cada muestra. Se midió la intensidad de fluorescencia en función del tiempo y se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.



Figura, 8, Esquema de la utilización de la fibra óptica acoplada a fluorómetro.

17. Extracción de porfirinas a partir de ALA de tejidos

Los animales topcados o inyectados con ALA o sus derivados o los dendrímeros, fueron sacrificados en atmósfera de CO₂, previa inyección con heparina (0,15 ml, 1000 UI) y luego del sacrificio se perfundieron con 200 ml de solución fisiológica estéril. Se extrajeron los órganos y el tumor para luego homogeneizarse en una solución de acetato de etilo: ácido acético glacial (4:1) (Falk, 1964). Las mezclas se centrifugaron por 30 min a 3000 g, y las porfirinas de la fase acuosa se extrajeron con HCl 5%, repitiéndose la extracción hasta que no se detectó fluorescencia en la fase orgánica. Se utilizó un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55, fijando la longitud de onda de emisión en 604 nm y la longitud de onda de excitación en 406 nm, parámetros que permiten detectar tanto las porfirinas hidrofílicas como las hidrofóbicas. Como estándar de referencia se empleó PpIX (New Frontiers, EE.UU.).

18. Extracción de porfirinas a partir de TAPP de tejidos

Se siguió el mismo protocolo de sacrificio descrito en 17. Luego, la extracción del FS de los órganos se realizó con DMSO, utilizándose también un homogeneizador para el proceso. Luego de centrifugar los homogenatos, el sobrenadante conteniendo el FS se midió fluorométricamente empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 425 y 660 nm, respectivamente. Se empleó un estándar de TAPP disuelto en DMSO como referencia. Se extrajo la

sangre por punción cardíaca, la cual se vortexeó en presencia de DMSO y se centrifugó para continuar su cuantificación fluorométrica al igual que el resto de los tejidos.

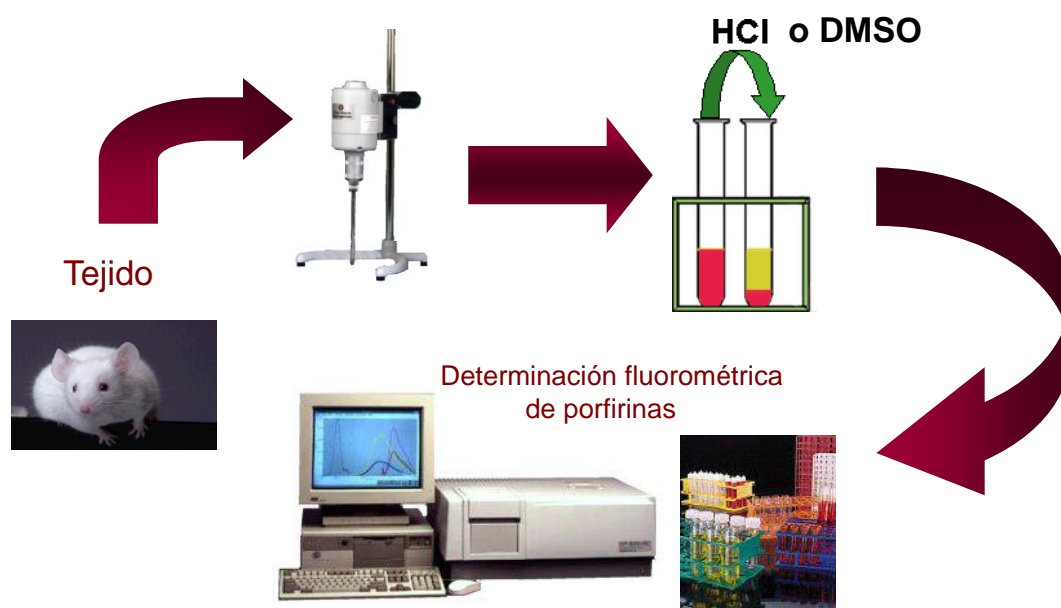


Figura 9, Esquema de extracción de porfirinas intracelulares a partir de tejidos,

19. Distribución de porfirinas en el tumor y la piel adyacente al tumor por microscopía de fluorescencia

La distribución de porfirinas después de la aplicación tópica de ALA, Ac-Phe-ALA-Me y TAPP, en muestras de ratones portadores de tumor de inoculación subcutánea se analizó por microscopía de fluorescencia. Las muestras de tumor junto con la PAT, se congelaron y embebieron en Crioplast®, y se cortaron en criostato en secciones de 15 μ m de espesor. Las muestras y secciones se manipularon bajo condiciones de iluminación tenue. Se realizó la observación microscópica de la fluorescencia roja de las porfirinas empleando un microscopio Olympus BX51 utilizando excitación a 545 nm utilizando un filtro paso banda de 545 nm y las imágenes se registraron usando una cámara Q-color 5. Después de la observación de fluorescencia, las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para identificación de las estructuras.

20. Procedimiento de Terapia Fotodinámica in vivo

Los ratones se rasuraron en la zona tumoral y se anestesiaron con una mezcla de xilazina/ketamina. Se procedió a la irradiación de la zona tumoral haciendo incidir la fibra óptica de un láser Lumiia de 635 nm a una distancia de 3 cm del ratón, cubriendo un área de iluminación de 1 cm de diámetro. Se probaron distintas potencias y tiempos de iluminación, y se fijaron como óptimos, la irradiación de llevó a cabo durante 20 min con una potencia de 150 mW.

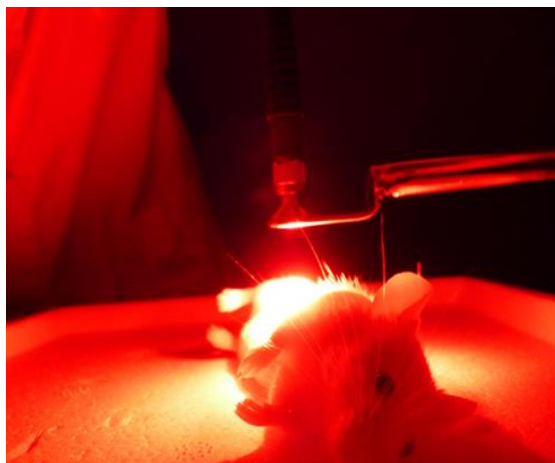


Figura 10. Procedimiento de iluminación

Para las irradiaciones *in vivo* se empleó un láser Lumiia de fabricación nacional acoplado a una fibra óptica con difusor plano. La longitud de onda emitida es de 635 nm $\pm 0,25\%$ (rojo), con una potencia variable entre 10 a 2500 mW $\pm 3\%$ Resol, 10 mW, modo de exposición continuo, y apertura numérica 0,22.

21. Estudios histológicos luego de TFD in vivo

Luego de 24 h de la TFD, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores junto a la piel circundante. Los tejidos se fijaron en formol, se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 10 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se analizó la presencia de necrosis tumoral, daño epidérmico y dérmico.

22. Análisis estadístico

Los valores en las figuras y tablas correspondientes a los experimentos son expresados como la media \pm los desvíos estándar. En el caso de los experimentos *in vivo* se emplearon tres ratones por grupo de tratamiento. *In vitro* cada ensayo se realizó por duplicado y en tres ensayos independientes. Se utilizó el t-test de Student despareado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

23. Referencias

- BALLATORE, MB, et al. Synthesis spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin–fullerene C60 dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *European journal of medicinal chemistry*, 2014, vol. 83, p. 685-694.
- BATTAH, S. et al. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate chemistry*, 2001, vol. 12, no 6, p. 980-988.
- CAMINOS, D. et al. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, no 05, p. 334-342.
- DENZINOT, F.; LANG. R. *J. Immunol. Methods* 1986, vol 89, p. 271.
- DUNN, W. et al. Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, vol. 255, no 12, p. 5971-5978.
- EVANS, P. et al. Antioxidant properties of S-adenosyl-L-methionine: a proposed addition to organ storage fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, vol. 23, no 7, p. 1002-1008.
- FALK, J. Porphyrins and Metalloporphyrins (BBA Library. Vol. 2). *Elsevier*. Amsterdam, 1964, p. 181.
- FERREYRA, D. et al. Synthesis and photodynamic properties of 5. 10. 15. 20-tetrakis [3-(N-ethyl-N-methylcarbazoyl)] chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, vol. 282, p. 16-24.
- GALLI, S. et al. Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *International journal of oncology*, 2000, vol. 17, no 6, p. 1259-1324.
- GIUNTINI, F, et al. Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolism. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, vol. 52, no 13, p. 4026-4037.
- GOLA, G, et al. Synthesis of chemically diverse esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy via the multicomponent Passerini reaction. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no 92, p. 89492-89498.

- HARDING, C, et al. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 1983, vol. 97, no 2, p. 329-339.
- KAWADA, K, et al. Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta Medica Okayama*, 2002, vol. 56, no 3, p. 129-134.
- LEILA, J, et al. Cytotoxic effects of some common organic solvents on MCF-7. RAW-264.7 and human umbilical vein endothelial cells. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 2016, vol. 4, no 1, p. 10-33453.
- MORA, J, et al. Spectroscopic and photodynamic properties of 5. 10. 15. 20-tetrakis [4-(3-N. N-dimethylaminopropoxy) phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, vol. 270, p. 75-84.
- ROGERS, L, et al. An efficient synthesis of 5-aminolaevulinic acid (ALA)-containing peptides for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2005, vol. 61, no 29, p. 6951-6958.
- SMITH, A.; MORGAN. W. T. J. *Biol. Chem.*, 1981, vol 256, pag 10902- 3.
- TAKEYA, H. Preparation of 5-aminolevulinic acid alkyl esters as herbicides. En *Chem. Abstr.*, 1992, p.116.
- URTREGER, A, et al. Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines. *International journal of oncology*, 1997, vol. 11, no 3, p. 489-496.
- VAN DEN AKKER, J, et al. Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid Hexyl Ester and 5-Aminolevulinic Acid to Normal Nude Mouse Skin: Differences in Protoporphyrin IX Fluorescence Kinetics and the Role of the Stratum Corneum. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 72, no 5, p. 681-689.
- VAN DEURS, B, et al. Delivery of internalized ricin from endosomes to cisternal Golgi elements is a discontinuous. temperature-sensitive process. *Experimental cell research*, 1987, vol. 171, no 1, p. 137-152.
- WERBAJH, S, et al. Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells. *FEBS letters*, 1998, vol. 440, no 3, p. 277-281.
- WORKMAN, P, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer*, 2010, vol. 102, no 11, p. 1555.



RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Estudio de nuevos FS para su uso en la Terapia Fotodinámica del cáncer

La búsqueda de nuevos FS con un alto rendimiento de $^1\text{O}_2$, mayor selectividad por la célula blanco y una farmacocinética favorable para su administración, es una de las metas más atractivas de la investigación en TFD. Es por ello que, dado sus características, hemos elegido trabajar con FS cuyas moléculas tienen como base a las porfirinas.

Otros FS como los derivados de las clorinas y las ftalocianinas tienen menor solubilidad en agua que las porfirinas, lo que limita su acción. Las estrategias para superar estas desventajas suelen implicar la incorporación de grupos catiónicos o aniónicos, péptidos, β -ciclodextrinas, éteres corona, glicerina, etc (Chilakamarthi y Giribabu, 2017).

La potencialidad de las porfirinas ha resurgido en los últimos años con la optimización en la metodología de síntesis de porfirinas no naturales, lo que ha dado lugar a la obtención de nuevos compuestos. Los sustituyentes en posiciones meso en relación a la posición beta encontrada en porfirinas naturales como la PpIX, han sido reportados como prometedores. Este hecho, sumado a la presencia de sustituyentes simétricos o asimétricos en el macrociclo, que influyen en las propiedades fotofísicas y la interacción con biomembranas, puede aumentar la potencialidad de las porfirinas como FS (Lazzeri y Durantini, 2003).

En base a este concepto, se estudiaron cinco nuevos compuestos: cuatro cuya base es una porfirina y uno con base de clorina, como potenciales FS en TFD. Como modelo biológico, utilizamos la línea murina de adenocarcinoma mamario LM3, tanto para los estudios *in vitro* como *in vivo*.

Los compuestos analizados en este capítulo (Figura 1.1) son fenilporfirinas meso-sustituidas, es decir, los grupos funcionales se ubican sobre los puentes de tipo metino, a diferencia de la sustitución beta encontrada el grupo hemo y la clorofila, donde los sustituyentes se ubican sobre los pirroles del anillo (Princ, 1995). Los compuestos sintetizados presentan la típica banda de absorción de Soret 380-450 nm, donde absorbe el macrociclo, y cuatro bandas denominadas Q, entre 515 y 650 nm, características de derivados de porfirinas tetrafenil sustituidas. La porfirina TEMCP presenta sustituyentes simétricos carbazólicos que aportan en total una carga neta positiva de 4+, así como su clorina derivada TEMCC (Ferreira et al., 2014). El derivado TAPP presenta también simetría en sus

sustituyentes, conteniendo el grupo aminopropoxilo, el cual contiene una amina terciaria de solubilidad media (Mora et al., 2013). La molécula A₂B₂ es una trans-porfirina, con dos grupos sustituyentes diferentes: el grupo aminopropoxilo (cargado positivamente) y el trifluorometilo (hidrofóbico), que la dotan de un carácter anfipático (Camino et al., 2005).

Finalmente, la molécula TCP-C₆₀, se trata de una diada de una porfirina y un fullereno, por cicloadición entre la 5-(4-formilfenil)-10,15,20-tris [3-(N-etilcarbazoil)] porfirina, N-metilglicina y el ácido C₆₀. La porfirina resultante es una porfirina con sustituyentes asimétricos, ya que cuenta con tres sustituyentes idénticos carbazólicos, y un residuo dispar con el fullereno (C₆₀), con carga positiva 4+ sobre el nitrógeno de sus sustituyentes (Ballatore et al., 2014).

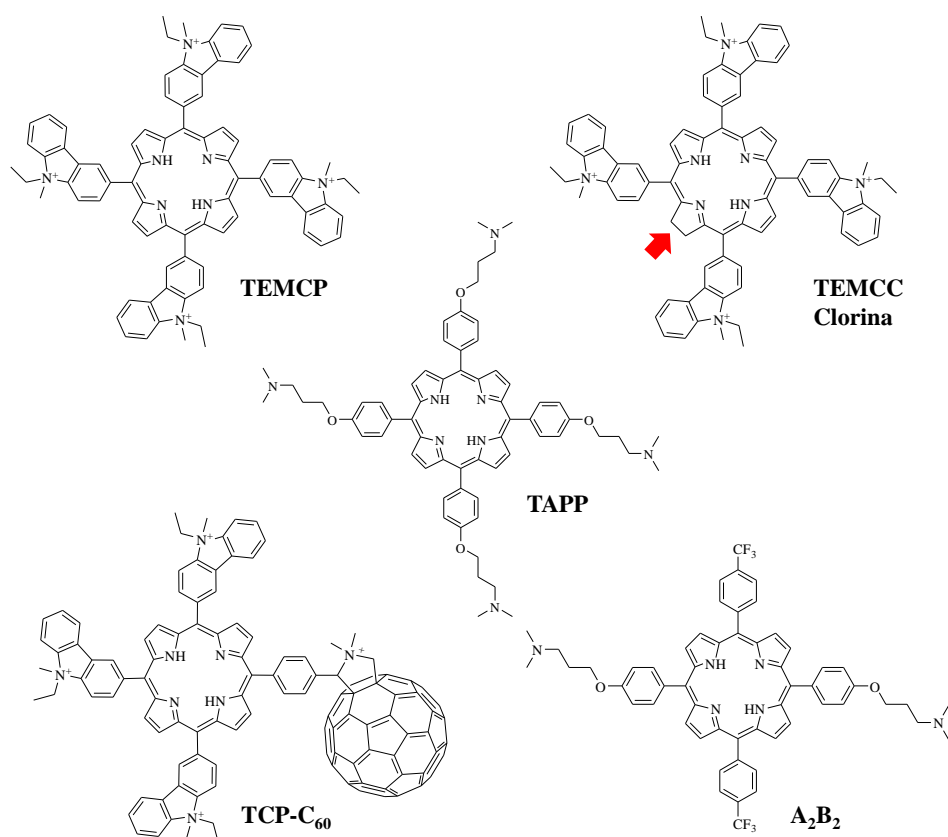


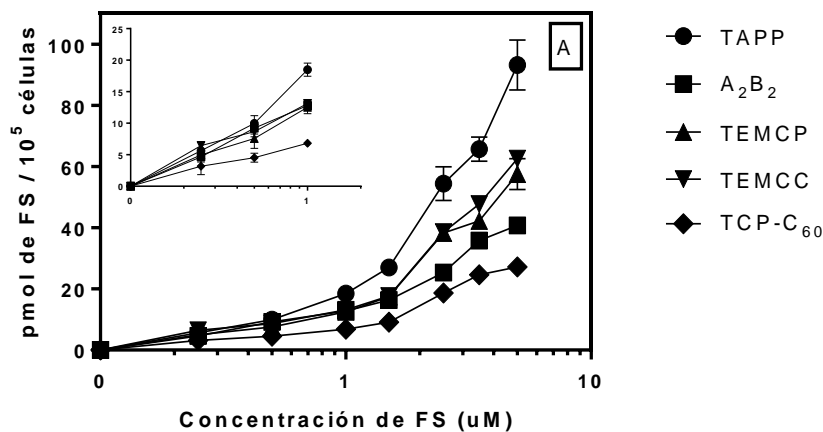
Figura 1.1. Estructura de los compuestos porfirínicos meso-sustituídos.

1.1. Incorporación de porfirinas *in vitro*

Las células de la línea tumoral de carcinoma mamario murino LM3, fueron incubadas durante 3 y 24 h en presencia de concentraciones crecientes de los FS (Figura 1.2), y luego de este período de tiempo se extrajeron con DMSO para

cuantificar la cantidad incorporada a las células (Mat. y Mét. sección 6 y 8). Se registró la fluorescencia emitida por los FS como forma de cuantificar su incorporación a las células, y se observó que la misma aumenta en función de la concentración de FS agregado, sin llegar a un plateau o máximo de incorporación en el rango de concentraciones estudiadas. Observando los perfiles de fluorescencia a 3 h de incubación y a 5 μM , es posible distinguir tres grupos: a) el primero de mayor fluorescencia (incorporaciones mayores a 60 pmol de FS/ 10^5 células), y en consecuencia mayor captación, representado por la porfina TAPP; b) le sigue el grupo de TEMCC, TEMCP y A_2B_2 , con una fluorescencia media (incorporaciones entre 25 a 60 pmol de FS/ 10^5 células); y c) finalmente el último grupo lo conforma el FS acoplado al fullereno (TCP- C_{60}) con la menor cantidad de fluorescencia registrada en el ensayo (incorporación menor a 20 pmol de FS/ 10^5 células). La fluorescencia registrada a 24 h es notablemente más elevada que a las 3 h, siendo de alrededor de un 60 a un 25% mayor dependiendo del compuesto a las concentraciones más altas evaluadas.

Todas las concentraciones evaluadas son subtóxicas. Los compuestos TEMCC y TEMCP resultaron tóxicos a concentraciones superiores a 10 μM (datos no mostrados).



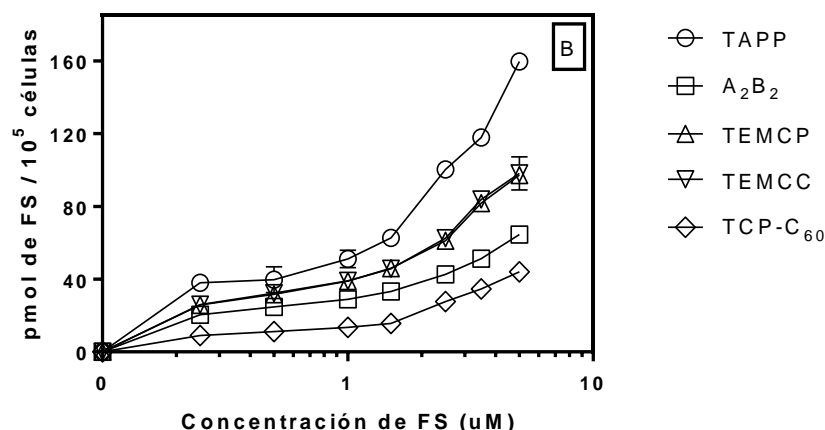


Figura 1.2. Porphirinas incorporadas en células LM3 en función de la concentración del FS agregado. Se incubaron células de la línea LM3 con concentraciones crecientes de FS durante 3 h (A) o 24 h (B) a 37°C, se lavaron y se extrajeron las porfirinas incorporadas con DMSO y se cuantificaron fluorométricamente.

1.2. Terapia fotodinámica *in vitro* a partir de porfirinas sintéticas

La Figura 1.3 muestra el efecto de la TFD en función de la dosis creciente de luz (Mat. y Mét., sección 9) luego de incubar 3 h y 24 h con los FS en concentraciones de 2,5 y 5 μM . Las DL_{50} s provenientes de estas Figuras se resumen en la Tabla 1.1 para simplificar su análisis. Del análisis de las incubaciones a 3 h surge lo siguiente: a) de manera concordante con los resultados obtenidos de la extracción intracelular de los compuestos, TAPP resultó ser el compuesto con mayor capacidad de fotodaño a menores concentraciones, con DL_{50} s a las 3 h de incubación, iguales a 35,7 y 22,9 mJ/cm^2 para 2,5 μM y 5 μM , respectivamente; b) la porfirina con el fullereno TCP-C₆₀ fue la que menor fotoactividad demostró, obteniéndose una DL_{50} elevada (280 mJ/cm^2) sólo con la mayor concentración empleada, c) TEMCC, TEMCP y A₂B₂ ejercieron niveles medios de fotosensibilización, con DL_{50} s entre 90 y 135 mJ/cm^2 , siendo levemente más efectivos a las concentraciones más altas empleadas.

Empleando períodos de incubación de 24 h, a pesar de que de la Figura 1.2 surge que la acumulación de FS intracelular es mayor que a las 3 h, los DL_{50} s no se correlacionan de manera directa con la concentración de FS, ya que mientras que TAPP fue ligeramente menos efectivo a las 24 h, TEMCC, TEMCP y A₂B₂ fueron entre 10% a 20% más fotoactivos, y el TCP-C₆₀ aumentó al doble su eficiencia de fotosensibilización.

Tabla 1.1 DL₅₀s para los nuevos FS en células LM3 calculados a partir de la Figura 1.3

DL ₅₀ (mJ/cm ²)						
Incubación	Concentración	TAPP	TEMCC	TEMCP	A ₂ B ₂	TCP-C ₆₀
3 h	2,5 µM	35,7	100,6	101,2	136,2	-
	5 µM	22,9	88,9	92,0	99,8	280,0
24 h	2,5 µM	34,6	87,4	97,2	112,5	-
	5 µM	35,8	80,4	66,7	87,4	125,0

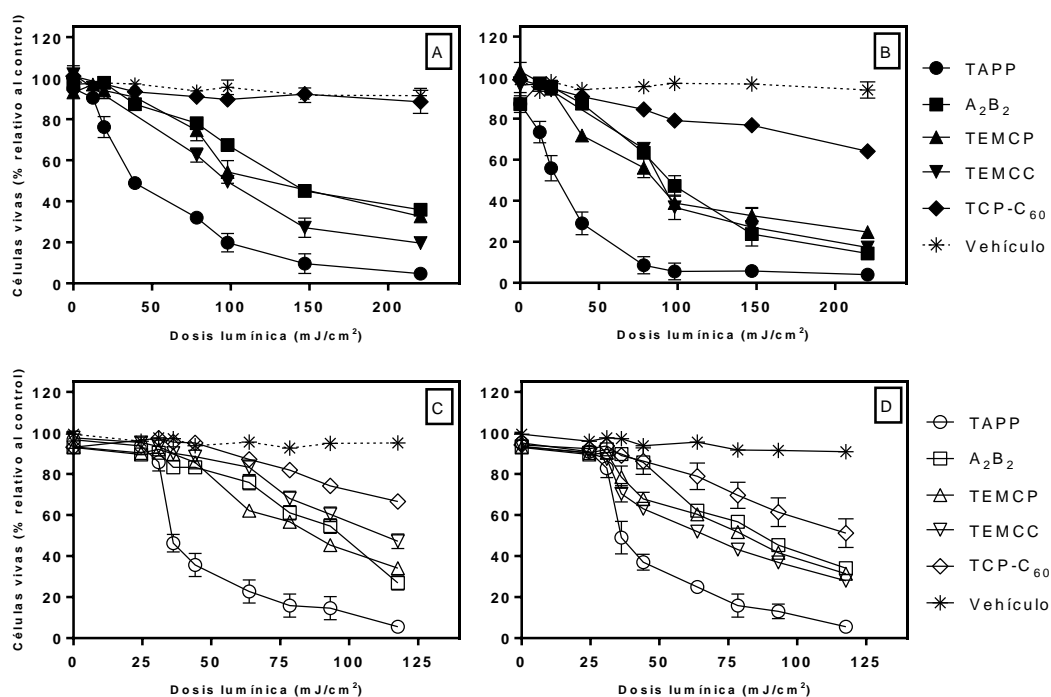


Figura 1.3. TFD *in vitro* en células LM3. Se incubaron las células en presencia de 2,5 o 5 µM de FS durante 3 h y 24 h, luego se realizó la TFD. A) 2,5 µM y B) 5 µM de FS durante 3 h respectivamente. C) 2,5 µM y D) 5 µM de FS durante 24 h. * Vehículo: células expuestas al solvente de dilución a la concentración máxima evaluada.

A partir de estos resultados se decidió continuar los estudios con TAPP por ser el compuesto más prometedor.

1.3. Estudios de incorporación de TAPP a la célula

La Figura 1.4.A muestra las contribuciones de los transportes activo y pasivo en el proceso de incorporación de TAPP; inferido a partir de la captación intracelular y del efecto fotodinámico luego de haber incubado las células con los FS a 4°C y a 37°C durante un período de incorporación de 90 min. Según fue descripto en Mat. y Mét. sección 12, las células fueron incubadas a las dos temperaturas mencionadas en presencia de TAPP, lavadas y sometidas a extracción con DMSO (Figura 1.4A) o a la TFD con distintas dosis lumínicas (Figura 1.4 B) (Mat. y Mét. sección 12.1). A partir de ello, se observó que la captación intracelular de TAPP a 4°C disminuyó entre un 60 a un 70% en comparación con la condición de 37°C. Con respecto a la TFD se muestra que existe una proporción de moléculas que son incorporadas mediante transporte pasivo, ya que se observa respuesta a la TFD a 4°C (DL_{50} 202,5 mJ/cm²); sin embargo, se observa que el transporte activo contribuye sustancialmente a la incorporación, induciendo una respuesta a la TFD que es significativamente mayor a los 37°C (DL_{50} 68,0 mJ/cm²). De esta manera a partir del bloqueo del transporte activo se obtiene una disminución del 66% en la eficacia de la terapia.

Prosiguiendo con los estudios sobre los mecanismos de incorporación de TAPP, y a fin de elucidar el mecanismo de endocitosis involucrado en el transporte activo de TAPP, se realizó el ensayo de bloqueo de la fusión de endosoma y lisosoma en el mecanismo de endocitosis. Para ello se incubaron las células con el FS a 18°C ó 37°C durante el período de incorporación del FS (3 h) y luego se realizó la cuantificación de la fluorescencia de los FS incorporados y la TFD (Mat. y Mét. Sección 12.1), no encontrándose diferencias significativas entre ambas temperaturas, sugiriendo que este proceso en la endocitosis no se encuentra involucrado en la incorporación intracelular de TAPP (datos no mostrados).

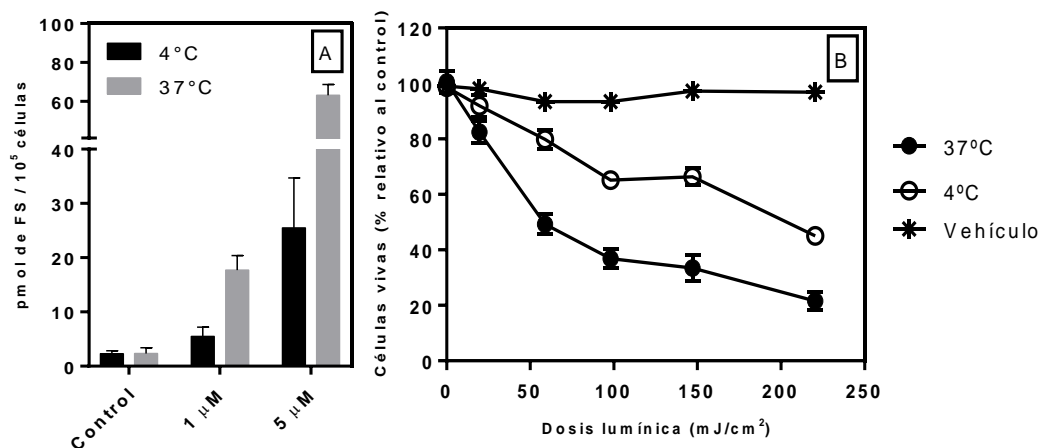


Figura 1.4. Elucidación del mecanismo de transporte de TAPP en las células. A) Captación diferencial de TAPP 1 y 5 μM a 4° y 37°C durante 90 min y cuantificación del FS incorporado, B) Fotodaño inducido por las porfirinas incorporadas luego de un período de 90 min a 4° y 37°C de 5 μM de TAPP. Vehículo: células expuestas al solvente de dilución a la concentración máxima evaluada.

1.4. Localización subcelular e incorporación de TAPP en función del tiempo

A fin de estudiar el efecto del tiempo de incorporación de TAPP a la célula sobre en efecto fotodinámico, se realizaron ensayos de TFD luego de permitir la entrada del FS a tiempos cortos (5 min) o largos (180 min) (Figura 1.5). En este ensayo se observó que la DL_{50} fue de 39,6 mJ/cm² a los 180 minutos y de 96,3 mJ/cm² a los 5 minutos de incubación con TAPP, demostrándose que se precisan dosis lumínicas mucho mayores al reducir los tiempos de incubación con el FS, demostrando que si bien a tiempos cortos hay una entrada del FS a la célula, el mismo se acumula en mayor medida en función del tiempo en el rango estudiado.

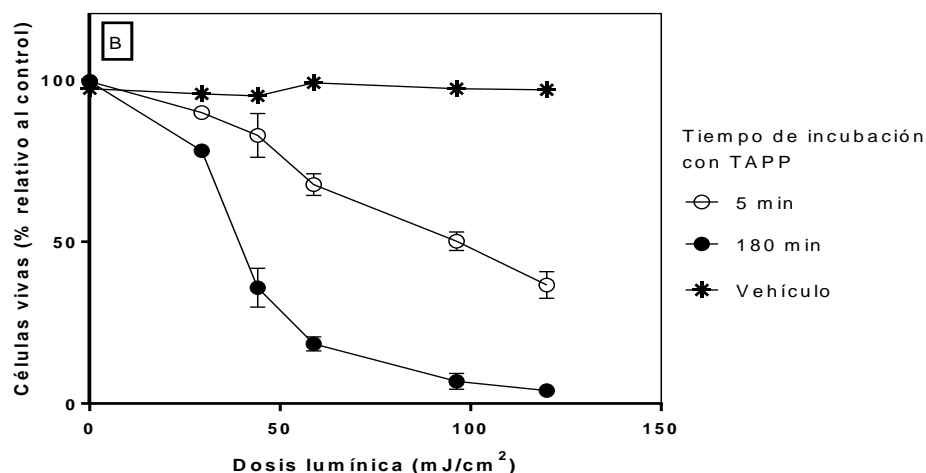


Figura 1.5. Influencia del tiempo de captación de TAPP en la TFD en células LM3. Células LM3 se expusieron durante 5 ó 180 min a TAPP 2,5 μ M a 37°C, se lavaron y se irradiaron con distintas dosis lumínicas. El efecto fotodinámico se registró mediante el ensayo del MTT. Vehículo: células expuestas al solvente de dilución a la concentración máxima evaluada.

Utilizando microscopía de fluorescencia, se analizó la captación de TAPP en el tiempo. Para este ensayo, las células fueron sembradas y crecidas en cubreobjetos durante 48 h, lapso luego del cual se incubaron con la solución de 2,5 μ M de TAPP durante 5, 30 y 180 min. Luego se analizó la incorporación mediante microscopía de fluorescencia utilizando filtros de excitación adecuados para visualizar TAPP.

En la Figura 1.6 se observa el ingreso de TAPP a las células LM3 en todos los tiempos evaluados (5, 30 y 180 min), correlacionándose estas imágenes con los resultados obtenidos en los ensayos de incorporación de TAPP a tiempos cortos y TFD (Figura 1.5), y se correlacionan además con la contribución del transporte pasivo al proceso. A los 5 min se distingue un patrón de distribución difuso a nivel citoplasmático, en tanto que, a partir de los 30 min, se observa un patrón puntiforme concentrado en estructuras subcelulares.

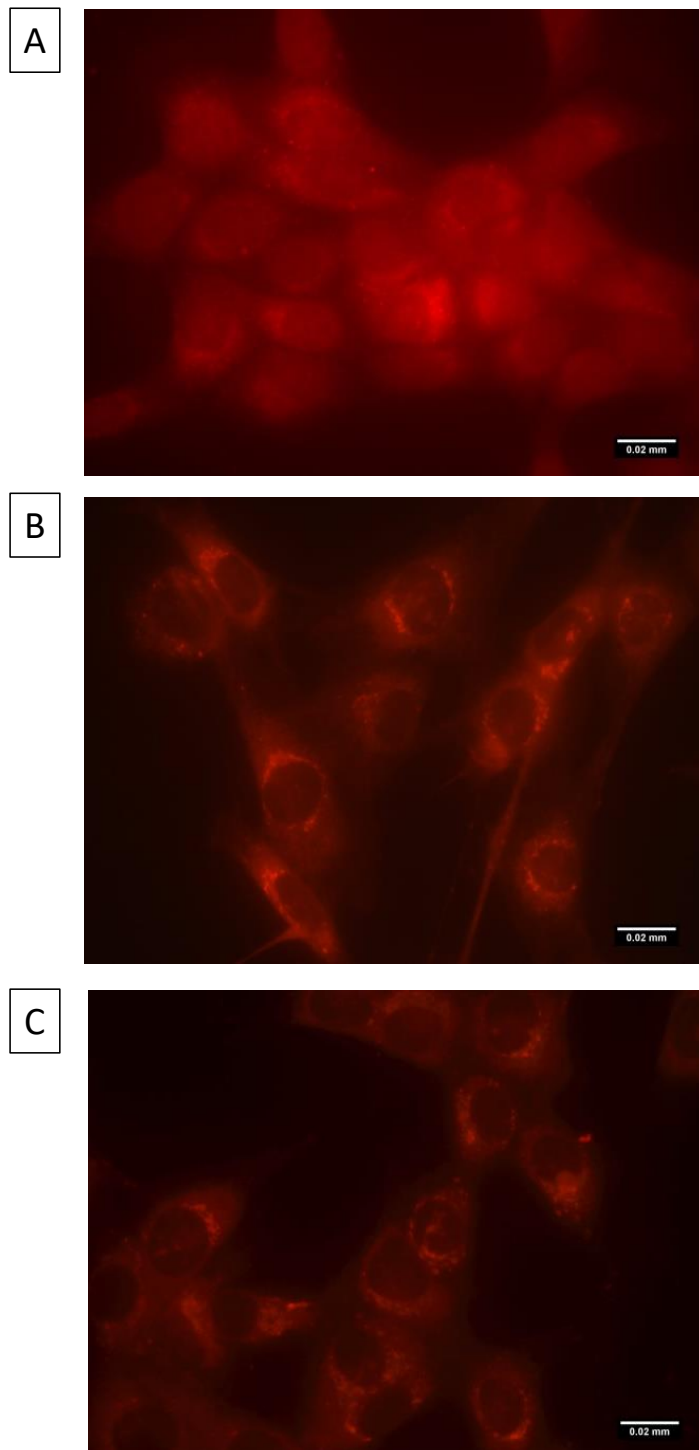


Figura 1.6. Distribución de TAPP a distintos tiempos en células LM3. Las células fueron crecidas en cubreobjetos durante 48 h. Seguidamente, se incubaron a diferentes tiempos con TAPP 2,5 μ M. A = 5 min, B = 30 min y C = 180 min. Luego se visualizó la fluorsecencia roja de TAPP mediante microscopía de fluorescencia. Aumento 100X.

Con el fin de conocer el sitio subcelular desde el cual TAPP ejerce su efecto fotosensibilizante, se utilizaron sondas fluorescentes específicas para lisosoma (LysoTracker Green), mitocondria (Myto Tracker Green) y aparato de Golgi

(NBD C6-Ceramida) y así evaluar su colocalización con TAPP (Mat. y Mét., sección 13). En la Figura 1.7 se puede observar que existe colocalización del FS con la sonda para el aparato de Golgi, y a su vez se observa un patrón difuso a nivel citoplasmático el cual no es atribuible a las mitocondrias ni a los lisosomas.

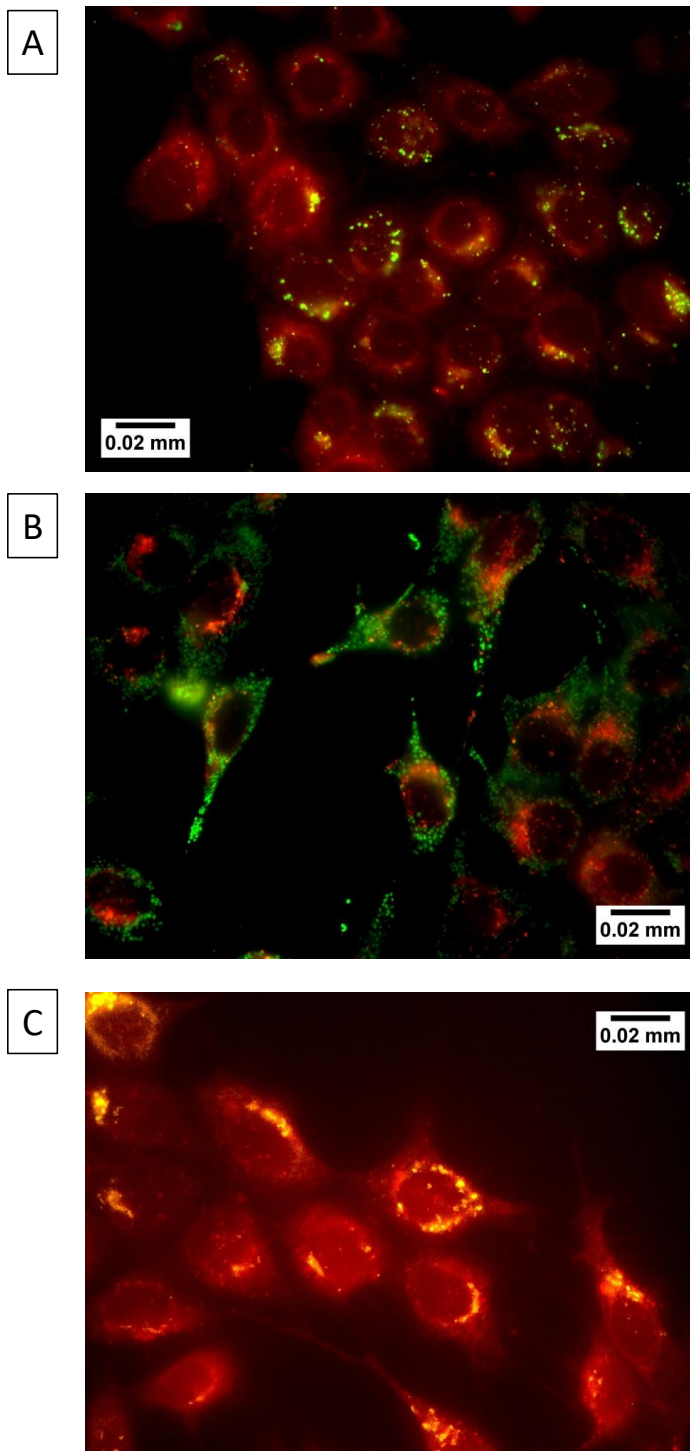


Figura 1.7. Localización subcelular de TAPP en células LM3. Las células se expusieron durante 30 min a una concentración de TAPP de 2,5 μ M, y las sondas fluorescentes Lyso Tracker Green (A), Mito Tracker Green (B) y NBD C6-Ceramida (C) y se observaron en microscopio de fluorescencia. Aumento 100X.

1.5. Ensayos *in vivo*: TAPP tópico

Para los ensayos *in vivo* tópicos con TAPP se empleó un sistema de detección de fluorescencia mediante fibra óptica acoplada a un fluorómetro (Mat. y Mét., sección 16), analizándose la presencia de la porfirina en función del tiempo. La Figura 1.8 muestra la acumulación de TAPP en la piel adyacente al tumor (PAT) y piel distante luego de la topicación del compuesto (Mat. y Mét., sección 17) sobre la PAT de ratones portadores de tumor LM3 (Mat. y Mét., sección 15). La fluorescencia obtenida en la PAT es mucho más elevada que la registrada en la piel distante (flanco contralateral a la topicación). La relación entre PAT y piel distante es de 7 hasta las 6 primeras h luego de la administración, y mayor a 4 veces hasta las 36 h, demostrando la retención de TAPP en el sitio de aplicación hasta largos tiempos luego del tratamiento.

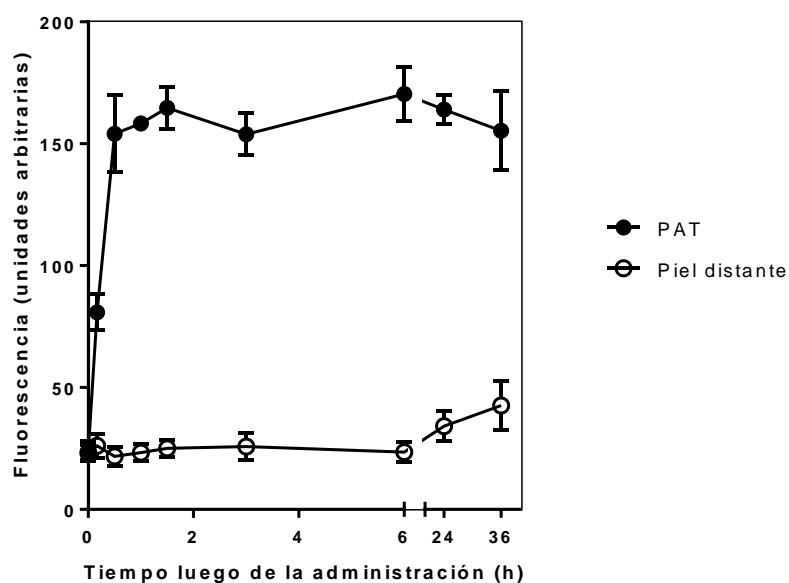


Figura 1.8. Acumulación de TAPP en la PAT y piel distante luego de su aplicación tópica sobre la PAT de ratones portadores de tumor LM3. El compuesto fue aplicado tópicamente sobre la PAT (100 μ g TAPP en solución fisiológica conteniendo 10% de DMSO). Se muestra el promedio de los tres ratones por tratamiento.

1.6. Ensayos *in vivo*: TAPP tópico, biodistribución cutánea

Se realizaron cortes frescos de piel en la zona de la PAT topicada con TAPP en las mismas condiciones de la sección 1.5 de este capítulo, para ser observados bajo microscopio de fluorescencia y visualizar la profundidad de penetración de TAPP (Mat. y Mét., sección 16 y 18). Aquí se pone de manifiesto la retención de

TAPP en la epidermis, sin difundir a zonas más profundas como la dermis, el tejido graso, ni al tumor subcutáneo (Figura 1.9). Se puede observar sin embargo, la presencia con menor intensidad de fluorescencia en folículos pilosos y glándulas sebáceas. Tampoco se observa daño cutáneo producto de la aplicación del FS sobre la piel.

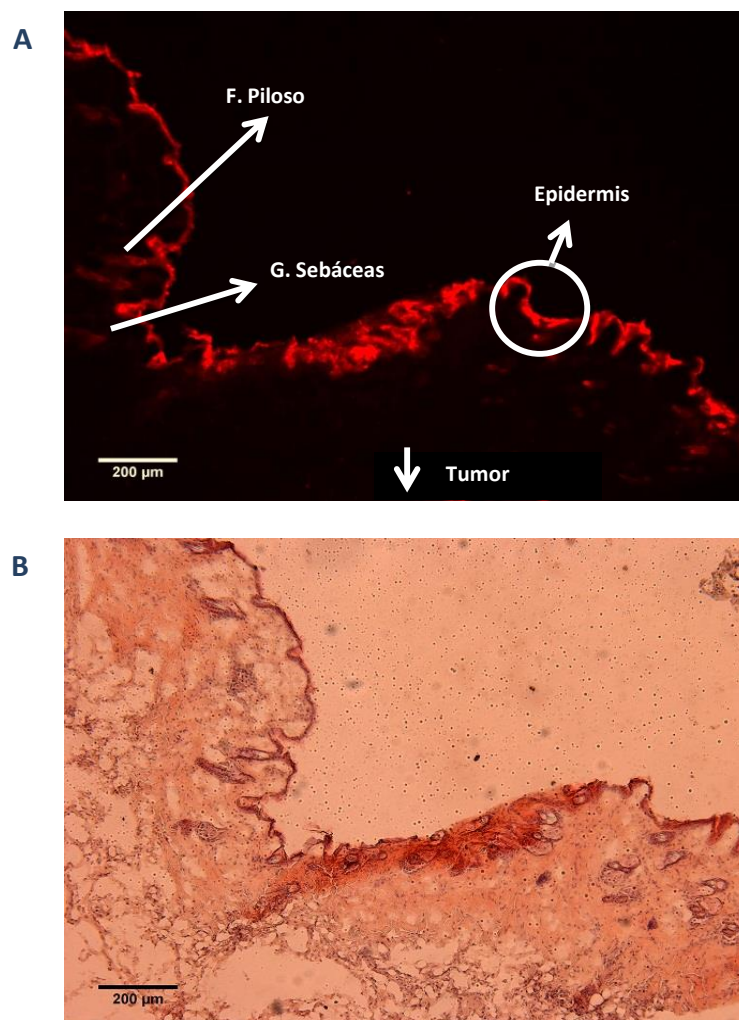


Figura 1.9. Topicación con TAPP de piel de ratón portador de ratón LM3. Microscopía de fluorescencia de corte fresco (A) Contratinción con hematoxilina-eosina (B). Aumento 20X.

1.7. Ensayos *in vivo*: TAPP sistémico y biodistribución

Se inyectó por vía intraperitoneal a ratones portadores de tumor LM3 una cantidad de TAPP que no resultara tóxica, escogida en ensayos previos realizados en ratones libres de tumor. Se inyectaron 4,06 mg/kg de TAPP en solución fisiológica con 10% de DMSO por ratón y luego de distintos tiempos, se cuantificó el FS acumulado en distintos órganos y en el tumor. Luego de 3, 24, 48 y 72 h de aplicada la inyección de TAPP, los órganos se homogeneizaron y se

extraño la porfirina acumulada en cada tejido según se detalla en Mat. y Mét., sección 17. Se observó que la cantidad de FS acumulado en el tumor y en los órganos fue máxima a las 24 h. A las 72 h aún se observó presencia de porfirinas en tejidos tales como el tumoral o la PAT (datos no mostrados).

En la Figura 1.10 se muestran los resultados obtenidos para el tiempo de 24 h post inyección. En relación con el control que mostró autofluorescencia variable dependiente del tejido analizado, se observaron las más elevadas concentraciones de TAPP, en tumor y PAT, siendo de 6,91 y 0,48 ng de TAPP/g de tejido respectivamente. Esto indica una acumulación selectiva 13 veces mayor en el tumor en relación a la piel adyacente. Interesantemente, se registraron concentraciones también elevadas en pulmón e intestino, con 4,76 y 3,82 ng de TAPP/g de tejido respectivamente. En tanto que, en el resto de los órganos tales como piel distante, riñón, hígado y bazo, se detectaron bajas cantidades de TAPP teniendo como referencia el control, mientras que en el cerebro no se detectó fluorescencia significativamente distinta a la del control. En sangre se cuantificó una cantidad circulante de TAPP, que se registró hasta las 72 h post administración (datos no mostrados).

La relación de TAPP en PAT: piel distante fue de 2,2, y de tumor: piel distante de 31,4. Estos resultados indican una clara selectividad de la molécula por el tumor y la PAT en relación a la piel contralateral sana, indicando que la presencia de TAPP en PAT se debe a la invasión de la misma por el tejido tumoral.

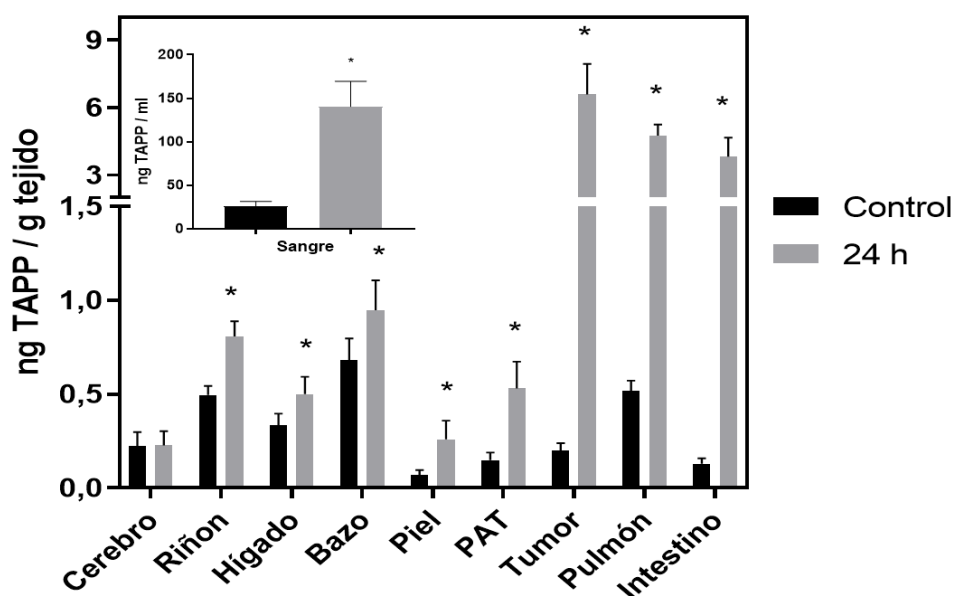


Figura 1.10. Administración sistémica y biodistribución de TAPP. Se administró vía i.p una solución de TAPP (4,06 mg/kg) y luego de 24 h la TAPP se extrajo de los tejidos con DMSO, y se cuantificó fluorométricamente. * P <0,01 en comparación con el control.

1.8. Discusión

Existe una necesidad creciente de desarrollar nuevos FS de uso en TFD que posean mayor selectividad por el tumor, menor fotosensibilidad cutánea y mayor eficiencia de sensibilización que los actuales. El número de FS en diferentes etapas de ensayos clínicos es grande e incluye principalmente varios tipos de compuestos tetrapirrólicos como los derivados de las porfirinas, las ftalocianinas y las clorinas. Todos estos compuestos se caracterizan por una gran banda de absorción entre 400 nm y 430 nm (banda Soret) y bandas de absorción más pequeñas (bandas Q) mayores a 550 nm. Las bandas Q por mayores a 600 nm son la más interesantes para los fines de la TFD, ya que poseen altos rendimientos cuánticos para las fotoreacciones de Tipo I o II y al mismo tiempo la luz de mayor longitud de onda a 600 nm penetra más profundamente en el tejido.

Sobre la base de sus propiedades fotofísicas, derivados naturales y sintéticos de las porfirinas han encontrado aplicaciones biomédicas, particularmente en el campo de la detección y tratamiento de tejidos neoplásicos (Milanesio et al., 2010).

Las porfirinas sustituidas por grupos catiónicos presentan propiedades interesantes para ser utilizadas como sensibilizadores específicos en sistemas biológicos. Estudios farmacocinéticos utilizando *meso*-tetra(4-*N*-metilpiridil)porfirina demostraron que este sensibilizador presenta una localización tumoral selectiva (Villanueva et al., 1993). La interacción específica de porfirinas catiónicas con sustratos biológicos produce un marcado incremento en la actividad fotodinámica respecto a las porfirinas neutras (Milanesio et al., 2003).

A partir de estos conceptos, se estudió la actividad biológica de 5 nuevos derivados de porfirinas mesosustituidas, algunos de los cuales poseen carga neta positiva. TEMCP y su análogo clorina TEMCC tienen cuatro grupos sustituyentes carbazólicos que aportan en total una carga neta positiva de 4+ (Ferreira et al., 2014). TAPP cuenta con cuatro grupos sustituyentes aminopropoxilo (Caminos et al., 2005), en tanto que la molécula A₂B₂ es una trans-porfirina con dos grupos sustituyentes: el grupo aminopropoxilo y trifluorometilo. Este último le aporta 2 cargas positivas (2+) (Caminos et al., 2005). Finalmente la molécula TCP-C₆₀, se trata de una porfirina y un fullereno unidos covalentemente (Ballatore et al., 2014) con una carga de 4+.

De los estudios *in vitro* de incorporación de los FS en células LM3 se observa que la fluorescencia aumenta de manera directa en función de la concentración, no

llegándose a un plateau o máximo de incorporación en el rango de concentraciones ensayadas.

Se encontró que TAPP tanto a tiempos de 3 h como 24 h de exposición, es el compuesto con mayor captación por la línea celular LM3, seguida de TEMCP y su clorina TEMCC. En menor medida, se incorporó la transporfirina A_2B_2 , y finalmente la porfirina unida al fullereno fue la que menor incorporación mostró, tal vez debido a la gran estructura tridimensional del C_{60} . Al incubar las porfirinas a 24 h se observó en todos los casos una mayor captación de todas las porfirinas respecto a las 3 h. Se observó una correlación directa entre cantidad de FS intracelular y grado de fotodaño comparando los distintos FS a un mismo tiempo, sin embargo, aunque la cantidad total de FS fue significativamente mayor a las 24 h respecto a las 3 h, el grado de aumento de FS no se vió directamente reflejado en un aumento de actividad fotosensibilizante en todos los casos. Mientras que TEMCC, TEMCP y A_2B_2 fueron entre 10 y 20% más fotoactivos, TAPP disminuyó su fotoactividad a las 24 h y el TCP- C_{60} fue el único que aumentó al doble su eficiencia de fotosensibilización. Este diferente comportamiento en el tiempo de los distintos FS sugiere que, dependiendo del FS y de la concentración intracelular alcanzada y del tiempo de incubación, el grado de fotoactividad es variable. La concentración intracelular de TAPP obtenida a 3 h podría estar saturando los blancos intracelulares de acción fotodinámica y más allá de esa concentración, las porfirinas acumuladas intracelularmente podrían estar agregadas y así provocar una disminución de su fotoactividad, tal como se ve reflejado con el comportamiento a las 24 h. Por otra parte, las porfirinas que poseen una eficiencia media de fotosensibilización tales como TEMCC, TEMCP y A_2B_2 , aumentan alrededor de un 25% su acumulación intracelular a las 24 h respecto a las 3 h, y su fotoactividad es incrementada de un 10 a un 20%. En cambio, el FS unido a fullereno TCP- C_{60} aumenta al doble su fotoactividad, en correlación con un 40% de aumento de captación a tiempos largos, aunque en este último caso se debe considerar que las reacciones fotoquímicas involucradas puedan tomar más tiempo en evidenciarse en fotodaño. El diseño de la diada como FS radicó en su capacidad potencial de aprovechar a la porfirina como una antena de longitudes de onda del rojo para luego transferir electrones al fullereno y así promover el fotodaño celular dirigido (Milanesio et al., 2005; Alvarez et al., 2006).

Las propiedades de los sustituyentes como así también la simetría de los mismos en el macrociclo parecen contribuir al ingreso de los FS a la célula. La combinación de cargas positivas en la periferia de la molécula se ha usado para incrementar el carácter anfipático de la porfirina, lo cual contribuye a la interacción con biomembranas (Lazzeri y Durantini, 2003; Caminos et al., 2005). En relación a lo descripto, los grupos amino básicos de la TAPP pueden adquirir

cargas positivas favoreciendo una mejor interacción con las biomembranas, dependiendo del microambiente biológico en el que la porfirina se localiza. Empleando un modelo de micelas invertidas como aproximación a las membranas biológicas, la TAPP mostró poseer mejor actividad fotodinámica en comparación con su análogo catiónico TAPP⁴⁺ (Mora et al., 2013).

Particularmente la TCP-C₆₀, es la porfirina que mostró un menor efecto fotodinámico. Este resultado se correlaciona con su menor captación celular. Adicionalmente, su rendimiento cuantico de producción de ¹O₂ es de 0,08, lo que representa unas 6 veces menor al resto de los FS (Ballatore et al., 2014). La escasa entrada de TCP-C₆₀, seguramente se deba a la presencia de su sustituyente voluminoso y la poca capacidad de endocitosis de la línea celular empleada. Foley et al. (2002) demostraron que la estructura C₆₁ (CO₂H) es capaz de atravesar la membrana plasmática, unirse a estructuras subcelulares y ejercer sus efectos. Sin embargo, su acoplamiento a la porfirina es posible que limite su ingreso. Las drogas unidas a un fullereno pueden diferir significativamente de las moléculas de fármaco libres correspondientes, en cuanto a la captación y distribución subcelular, como lo sugieren los resultados experimentales de Liu et al. (2010). Más allá de estas dificultades en sistemas eucariotas, es muy probable que sean una herramienta interesante en sistemas procariotas, ya que la fotoinactivación bacteriana es posible desde fuera de la célula, o también en células con capacidad fagocítica aumentada tales como macrófagos o ciertos tipos tumorales (Ballatore et al., 2018).

Los resultados hallados en esta tesis demuestran un claro potencial de TAPP como FS, bastante mayor que el resto de compuestos evaluados, motivo por el cual se continuó avanzando en los ensayos con esta porfirina, a fin de caracterizar su localización intracelular y mecanismo de ingreso a la célula. Se evaluó la contribución de los transportes activo y pasivo en el ingreso de TAPP a la célula, llevando a cabo ensayos a temperaturas de 37°C y 4°C (Smith y Morgan, 1981). Estos resultados mostraron una disminución en la eficiencia de la terapia del 60-70% al inhibir el transporte mediado por energía, lo que demuestra un cierto grado de actuación de transportadores activos y un importante rol del transporte pasivo. A su vez, las curvas de aumento lineal de la concentración intracelular de TAPP en función del tiempo de incubación denotan la importancia del transporte pasivo en la entrada de esta porfirina, y por estudios de inhibición de fusión lisosoma-endosoma se comprobó que el transporte por endocitosis no se encuentra involucrado.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia a diferentes tiempos de incubación de TAPP muestran que desde los 30 min hasta los 180 min, se observa un patrón de distribución en estructuras subcelulares citoplasmáticas. Para tratar de elucidar la ubicación subcelular de TAPP se utilizaron distintas sondas fluorescentes específicas de distintas organelas. Se observó una colocalización en la zona del aparato de Golgi, además de un patrón difuso citoplasmático, el cual no es atribuible a las mitocondrias ni a los lisosomas. La no localización de TAPP en lisosomas se condice con el resultado del ensayo a temperatura diferencial para estudiar el compromiso de la fusión endosoma- lisosoma en la adquisición del FS, donde no hubo diferencias significativas al bloquear este proceso. Esto sugiere que la porfirina no ingresa al lisosoma o se podría liberar del mismo antes de la fusión del endosoma con esta organela.

Algunos FS tienen un amplio espectro de sitios de localización subcelular que dependen del tipo celular, mecanismo de entrada, tiempo de incubación y concentración, entre otros factores. Citando algunos ejemplos, Photofrin® se localiza principalmente en el espacio del retículo endoplásmico (RE)-aparato de Golgi, y en menor medida en otros sitios perinucleares (Hsieh et al., 2003, 2010). Marchal et al. (2007) describió que el Foscan® después de 3 h de incubación en células MCF-7 se puede encontrar tanto en el RE como en el aparato de Golgi, pero después de 24 h se extruye desde el Golgi, ubicándose principalmente en el RE, con sólo una distribución débil en las mitocondrias. Estudios previos de nuestro laboratorio Rodriguez et al (2011), determinaron el destino intracelular de Photofrin® y Foscan® en células HB4a y HB4a-Ras, mostrándose localización a nivel mitocondrial, RE y citoplasmática difusa, además la clorina Ce6 presentó una localización predominante en la zona del Golgi. En relación a la clorina Ce6, otros autores encontraron que se ubica en sitios difusos del citoplasma fuera de las organelas o en el RE y aparato de Golgi (Merlin, 2003). El FS denominado verteporfina es un derivado porfirínico, se localiza en las mitocondrias y también en el área perinuclear donde se encuentran la membrana nuclear y el RE (Runnels et al., 1999; Osaki et al., 2006). El FS Pc4 también se localiza preferentemente en las mitocondrias y en membranas del complejo RE-Golgi (Rodriguez et al., 2009), y por el contrario, sus derivados que portan ligandos hidroxilo axiales se localizan en los lisosomas.

La mayoría de las porfirinas y sus derivados se localizan a nivel de las membranas celulares, incluidas las membranas citoplásmica, mitocondrial y lisosomal, del aparato de Golgi y del RE (Castano et al., 2004; Mojzisova et al., 2007). La alta polaridad de los FS hidrofílicos y aniónicos puede restringir su difusión pasiva a través de la membrana plasmática, y tales FS se internalizan típicamente por

endocitosis. En consecuencia, una localización primaria serían los lisosomas; un ejemplo de este comportamiento es la meso-tetrafenilporfirina tetrasulfonada (Berg et al., 1990; Sailer et al., 2000), aunque la talaporfina y la padeliporfina también tienden a localizarse en los lisosomas (Lui et al., 2011; Kessel et al., 2012). Por otra parte, FS más lipofílicos pueden difundir a través de la membrana plasmática, con mayor facilidad, y redistribuirse entre las membranas de las organelas celulares. La radaporfirina se ha determinado que tiene un tropismo por RE y el aparato de Golgi (Gomes da Silva, et al., 2018).

En relación a las porfirinas con cargas en su superficie, se ha sugerido que algunas porfirinas catiónicas se asocian principalmente a las mitocondrias, desencadenando un mecanismo de muerte celular apoptótico (Alvarez et al., 2004).

Carneiro et al. (2018) también encontraron localización en aparato de Golgi además de RE en todas las porfirinas catiónicas sintetizadas por ellos. La PpIX generada a partir de ALA o sus derivados se forma en la mitocondria de las células, pero se difunde rápidamente a otros sitios de la membrana intracelular. Gaullier et al. (1995) observaron una localización mitocondrial a tiempos de incubación cortos, sin embargo, a tiempos largos de exposición, los patrones más intensos eran en membrana plasmática y en la región perinuclear.

Los trabajos de Kepczynski et al. (2002) y Engelmann et al. (2007) con fenilporfirinas en vesículas lipídicas o extractos mitocondriales determinaron que la unión a estas estructuras es inversamente proporcional a la polaridad, y que la misma se puede predecir satisfactoriamente mediante los valores de coeficientes de partición de las porfirinas. Sin embargo, esta predicción no es válida para las porfirinas anfifílicas, que se unen a las vesículas o mitocondrias en cantidades más grandes y con mayor afinidad de lo que se predeciría en base solo a los valores coeficientes de partición.

Otra característica a tener en cuenta es que el macrociclo de tetrapirroles dota a la mayoría de las porfirinas y sus moléculas análogas con una fuerte tendencia a la agregación en soluciones acuosas neutra a partir del apilamiento de orbitales pi. En el caso de porfirinas meso sustituidas, el equilibrio dímero-monómero se vuelca hacia el dímero (Akins et al., 1996, Kano et al., 2000). Esta agregación, a la vez, afecta la captación y consiguiente localización subcelular de la molécula, además de alterar el proceso de absorción y fluorescencia generando corrimientos (Kessel et al., 2003). Es sabido que TAPP en solución acuosa se encuentra parcialmente agregado y que a pH fisiológico los grupos amino se encuentran en

equilibrio con la forma protonada otorgándole cargas positivas intrínsecas. Este efecto demostró un aumento considerable en su actividad foto-inactivadora de bacterias (Caminos et al., 2006).

En resumen, más allá de la estructura química global o los sustituyentes que porte el FS, parecería que la localización preferencial es dependiente de diferentes factores que actúan de manera conjunta, tales como carga eléctrica, grado de agregación, solubilidad, vehículo de administración y tiempo. A su vez, el microentorno biológico en el cual se encuentre el FS puede inducir cambios significativos en la fotofísica predecida en la solución dando lugar a comportamientos y rendimientos fotodinámicos diferentes a los esperados (Aveline et al., 1999).

Para estudiar la eficiencia fotodinámica de la TAPP *in vivo* se emplearon ratones BALB/c portadores de un tumor mamario murino implantado subcutáneamente de la misma línea celular empleada en los ensayos *in vitro*. La administración de TAPP se evaluó por dos vías: tópica e intraperitoneal sistémica. Los ensayos de topicación demuestran una retención completa por el estrato córneo de la piel, sin difusión a zonas más profundas. En relación a las vías de penetración de la piel es posible englobarlas en dos grandes grupos: transepidérmica y transpendicular. Las primeras incluyen la penetración a través de las membranas celulares o a través del cemento intracelular, en tanto que el transporte transpendicular hace alusión al conseguido a través del folículo piloso y las glándulas sudoríparas. La TAPP, sin embargo, no estaría pudiendo emplear ninguna de estas vías y, posiblemente debido a sus características fisicoquímicas, queda retenida en el estrato córneo. Esta limitación en la penetración de TAPP por vía local plantea la posibilidad de tratamiento de lesiones superficiales tales como queratosis actínica.

La TFD tópica, especialmente empleando drogas pro-FS, ofrece en la actualidad una alternativa terapéutica aprobada por la FDA para el tratamiento de los tumores de piel no melanóticos, y lesiones premalignas particularmente la queratosis actínica para el área de la cabeza y el cuello (Ericson et al., 2008).

En relación a los ensayos sistémicos, se ha logrado registrar TAPP en niveles significativos en tumor y PAT (invadida por el tumor), observándose a la vez una clara selectividad por estos tejidos en comparando con la piel sana en una relación de 31,4 y 2,2 para tumor y PAT respectivamente. La relación entre tumor y PAT es de 14 veces más en el tumor, lo que permite aventurar que la presencia del FS en la PAT se debe a la invasión de la misma por el tejido tumoral.

No se han registrado niveles significativos de TAPP en cerebro en relación al control, lo cual es una característica de interés a la hora de la administración sistémica de una droga y la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

También se han registrado niveles particularmente elevados de la porfirina en intestino y pulmón, demostrando una selectividad más que interesante a la hora de evaluarlo como posible blanco contra cáncer de colon y pulmonar. Ambos órganos son de fácil acceso por vía endoscópica con lo cual son un blanco factible de la TFD. Trabajos pioneros como los de Supniewski (1927) demostraban ya la facilidad de absorción de este último órgano del FS Hp, y su capacidad de fotosensibilización. Shayeghi et al. (2005) identificaron en intestino un nuevo transportador de hemo, el HDP1, demostrando además que este mismo transportador puede ser usado por FS porfirínicos. Además, la PpIX generada a partir de pro-drogas como el ALA o derivados de ALA esterificados, han demostrado la acumulación en intestino (Kato et al., 2012; Casas et al., 2015, Capítulo 3 de esta Tesis). En relación al cáncer pulmonar el Photofrin® ya se utiliza desde 1998 en TFD con gran éxito, siendo una de las aplicaciones aprobadas por la FDA, logrando preservar la función pulmonar, con un procedimiento mínimamente invasivo que tiene un buen nivel de tolerancia y permite una rápida recuperación (Shafirtein et al., 2016).

En conclusión, los resultados de este estudio evidencian que los FS porfirínicos meso sustituidos representan una estrategia alternativa para ampliar las aplicaciones actuales de la TFD. En esta tesis se emplearon 5 potenciales FS, de los cuales se eligió el de mayor respuesta fotodinámica para continuar los ensayos *in vivo*. Se demostró su potencial para el tratamiento tópico, con una gran retención en el estrato córneo y una muy baja tasa de penetración a través de la piel. Por otra parte, se observó una alta selectividad del TAPP inyectado por vía sistémica, por el tumor y la zona peritumoral; e interesantemente una acumulación intestinal y pulmonar, abriendo de esta manera nuevas posibilidades de aplicaciones de la terapia fotodinámica tanto con su modalidad de tratamiento como de fotodiagnóstico.

1.9. Referencias

AKINS, D, et al. Aggregation of tetraaryl-substituted porphyrins in homogeneous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 1996, vol. 100, no 13, p. 5420-5425.

ALVAREZ, G, et al. Pharmacokinetic and phototherapeutic studies of monocationic methoxyphenylporphyrin derivative. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004, vol. 1, no 4, p. 335-344

ALVAREZ, G, et al. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 12, p. 2092-2101.

AVELINE, B, et al. Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics?. *Photochemistry and photobiology*, 1999, vol. 69, no 3, p. 306-316.

BALLATORE, MB, et al. Mechanistic insight into the photodynamic effect mediated by porphyrin-fullerene C 60 dyads in solution and in *Staphylococcus aureus* cells. *RSC Advances*, 2018, vol. 8, no 41, p. 22876-22886.

BALLATORE, MB, et al. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin–fullerene C60 dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *European journal of medicinal chemistry*, 2014, vol. 83, p. 685-694.

BERG, K, et al. Intracellular localization of sulfonated meso-tetraphenylporphyrins in a human carcinoma cell line. *Photochemistry and photobiology*, 1990, vol. 52, no 3, p. 481-487.

CAMINOS, D, et al. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N, N, N-trimethylammoniumpropoxy) phenyl and 4-(trifluoromethyl) phenyl groups. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2006, vol. 5, no 1, p. 56-65.

CAMINOS, D, et al. Synthesis of asymmetrically meso-substituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2005, vol. 9, no 05, p. 334-342.

CARNEIRO, J, et al. Synthesis and in vitro PDT evaluation of new porphyrins containing meso-epoxymethylaryl cationic groups. *Lasers in surgery and medicine*, 2018.

CASAS, A, et al. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 2009, vol. 135, no 2, p. 136-143.

CASTANO, A, et al. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004, vol. 1, no 4, p. 279-293.

CHILAKAMARTHI, U; GIRIBABU, L. Photodynamic therapy: past, present and future. *The Chemical Record*, 2017, vol. 17, no 8, p. 775-802.

ENGELMANN, F, et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2007, vol. 39, no 2, p. 175.

ERICSON, M, et al. Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma. *Therapeutics and clinical risk management*, 2008, vol. 4, no 1, p. 1.

FERREYRA, D, et al. Synthesis and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [3-(N-ethyl-N-methylcarbazoyl)] chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, vol. 282, p. 16-24.

GAULLIER, JM, et al. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX in human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochemistry and photobiology*, 1995, vol. 62, no 1, p. 114-122.

GOMES-DA-SILVA, L, et al. Photodynamic therapy with redaporfin targets the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The EMBO journal*, 2018, p. e98354.

HSIEH, YJ, et al. Characterization of photodynamic therapy responses elicited in A431 cells containing intracellular organelle-localized photofrin. *Journal of cellular biochemistry*, 2010, vol. 111, no 4, p. 821-833.

HSIEH, YJ, et al. Subcellular localization of Photofrin® determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. *Journal of cellular physiology*, 2003, vol. 194, no 3, p. 363-375.

KANO, K, et al. Factors influencing self-aggregation tendencies of cationic porphyrins in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, vol. 122, no 31, p. 7494-7502.

KATO, S, et al. Fluorescence diagnosis of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in a mouse model of colon cancer. *Journal of surgical research*, 2012, vol. 176, no 2, p. 430-436.

KĘPCZYŃSKI, M, et al. Do Liposome-binding Constants of Porphyrins Correlate with Their Measured and Predicted Partitioning Between Octanol and Water?. *Photochemistry and photobiology*, 2002, vol. 76, no 2, p. 127-134.

KESSEL, D, et al. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy*, 2012, vol. 8, no 9, p. 1333-1341.

KESSEL, D, et al. Localization and Photodynamic Efficacy of Two Cationic Porphyrins Varying in Charge Distribution. *Photochemistry and photobiology*, 2003, vol. 78, no 5, p. 431-435.

LAZZERI, D; DURANTINI, E. Synthesis of meso-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. *Arkivoc*, 2003, vol. 10, p. 227-239.

LAZZERI, D; DURANTINI, E. Synthesis of meso-substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. *Arkivoc*, 2003, vol. 10, p. 227-239.

LIU, JH, et al. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. *ACS applied materials & interfaces*, 2010, vol. 2, no 5, p. 1384-1389.

LIU, L, et al. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, vol. 51, no 1, p. 53-68.

MARCHAL, Sophie, et al. Relationship between subcellular localisation of Foscan® and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *British journal of cancer*, 2007, vol. 96, no 6, p. 944.

MERLIN, JL, et al. The multidrug resistance modulator SDZ-PSC 833 potentiates the photodynamic activity of chlorin e6 independently of P-glycoprotein in multidrug resistant human breast adenocarcinoma cells. *International journal of oncology*, 2003, vol. 22, no 4, p. 733-739.

MILANESIO, E, et al. Methoxyphenyl porphyrin derivatives as phototherapeutic agents. *Current Bioactive Compounds*, 2010, vol. 6, no 2, p. 97-105.

MILANESIO, E, et al. Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenylporphyrin derivatives in homogeneous and biological media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2003, vol. 2, no 9, p. 926-933.

- MILANESIO, E, et al. Porphyrin-fullerene C60 Dyads with High Ability to Form Photoinduced Charge-separated State as Novel Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2005, vol. 81, no 4, p. 891-897.
- MOJZISOVA, H, et al. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2007, vol. 1768, no 11, p. 2748-2756.
- MORA, SJ, et al. Spectroscopic and photodynamic properties of 5, 10, 15, 20-tetrakis [4-(3-N, N-dimethylaminopropoxy) phenyl] porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2013, vol. 270, p. 75-84.
- OSAKI, T, et al. Intracellular localization and concentration as well as photodynamic effects of benzoporphyrin derivative monoacid ring A in four types of rodent tumor cells. *Cancer letters*, 2006, vol. 243, no 2, p. 281-292.
- PRINC, F. *Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata: Estudios sobre la porfobilinogeno-deaminasa. Empleo del ácido delta-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno*. 1995. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- RODRÍGUEZ, L. *Selectividad de la terapia fotodinámica empleando ALA y otros fotosensibilizantes. Rol de la vasculatura en el daño fotodinámico*. 2011. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- RODRIGUEZ, M, et al. Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria. *Photochemistry and photobiology*, 2009, vol. 85, no 5, p. 1189-1200.
- RUNNELS, J. M., et al. BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and β 1 integrin expression in ovarian cancer cells. *British journal of cancer*, 1999, vol. 80, no 7, p. 946.
- SAILER, R, et al. Plasma Membrane Associated Location of Sulfonated meso-Tetraphenylporphyrins of Different Hydrophilicity Probed by Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy. *Photochemistry and photobiology*, 2000, vol. 71, no 4, p. 460-465.
- SHAFIRSTEIN, G, et al. Photodynamic therapy of non-small cell lung cancer. Narrative review and future directions. *Annals of the American Thoracic Society*, 2016, vol. 13, no 2, p. 265-275.
- SHAYEGHI, M, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 2005, vol. 122, no 5, p. 789-801.
- SMITH, A.; MORGAN, W. T. (1981) *J. Biol. Chem.* 256,10902- 3.
- SUPNIEWSKI, J. The action of visible light on the haematoporphyrin sensitised organs. *The Journal of physiology*, 1927, vol. 64, no 1, p. 30-38.
- VILLANUEVA, A, et al. Photodynamic induction of DNA-protein cross-linking in solution by several sensitizers and visible light. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 1993, vol. 33, no 2, p. 239-244.

CAPÍTULO 2

Uso del ALA y derivados ésteres del ALA en células de Linfomas Cutáneos

Con el fin de mejorar la penetración del ALA a las células, la cual se ve disminuida por su característica hidrofílica, las modificaciones en dicha molécula han sido muy variadas, a lo largo de los últimos años. Las primeras modificaciones fueron introducidas por nuestro grupo, y correspondieron a la adición de pequeñas cadenas alifáticas mediante uniones éster, con el objetivo de aumentar la lipofilicidad de la molécula; esto dio lugar a compuestos prometedores como el Me-ALA y el He-ALA (Casas et al., 1999), de los cuales el primero ya ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de queratosis actínicas y el segundo para la fotodetección del cáncer temprano de vejiga.

El éxito de estos derivados facilitó el desarrollo de diversas moléculas de ALA modificadas con distintos grupos sustituyentes, entre ellos, ésteres cíclicos o aromáticos, grupos etilenglicol, halógenos y azúcares (Fotinos et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento ningún otro derivado ha superado al He-ALA en ensayos clínicos como para obtener aprobación para su comercialización y uso clínico.

Dado que la TFD y en particular la ALA-TFD son preferentemente propuestas para ser empleadas en el tratamiento de patologías cutáneas como podrían ser los Linfomas Cutáneos de Células T (LCCT) y unido a la escasa información que existe sobre el uso de esta terapia en esta patología, se propuso el objetivo de estudiar al ALA y derivados de esta molécula, en un modelo biológico de la misma.

Más aún, dado que el ALA y el Me-ALA han sido aprobados para el tratamiento de queratosis actínica, enfermedad de Bowen y carcinoma de células basales, en esta tesis se llevarán a cabo estudios *in vitro* preliminares que apuntan al reposicionamiento de estos pro-FS para el tratamiento de los LCCT.

Estos linfomas representan el 4% de los desórdenes no Hodgkin, estando el 60% representado por la Micosis Fungoide (MF) y Síndrome de Sézary (SS). La patología se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfoide T (CD3, CD4, CD54RO) intradérmico en etapas tempranas, infiltrando a través de la dermis, tejido subcutáneo, y órganos adyacentes en etapas avanzadas (Willemze, 2005). La característica particular del infiltrado linfoide T es su convocatoria en piel.

En colaboración con el grupo del Dr. Ramirez (UMYMFOR, UBA-CONICET) se generaron conjugados de ALA con grupos N-fenilacetamidas sustituidas. Previamente, algunos de estos nuevos compuestos fueron probados de manera preliminar en su capacidad de generar porfirinas en células de cáncer de mama y cáncer de ovario, mostrando gran éxito y la potencialidad de su uso en la TFD (Gola et al., 2016). Los compuestos más promisorios (Tabla 2.1) se utilizaron en este capítulo buscando evaluar la eficacia de la terapia utilizando ALA y sus derivados en las líneas de LCCT, Myla (modelo biológico de MF) y Hut78 (modelo biológico de SS). En la Tabla 2.1 se muestran las estructuras de los compuestos junto con el LogD que representa el grado de lipofilicidad.

Tabla 2.1. Estructura química y coeficiente de distribución (LogD) de ALA, Me-ALA, He-ALA y los nuevos derivados.

Compuesto	Estructura	LogD ^{oct/PBS ph 7,4}
1f		-0,45
1g		-0,082
1h		0,28
1i		0,69
1k		-0,082
ALA		-3,45
Me-ALA		-1,51
He-ALA		0,71

2.1. Síntesis de porfirinas *in vitro* a partir de ALA

Con el fin de conocer la concentración óptima de trabajo y así lograr comparar el ALA con los compuestos a evaluar, se analizó la síntesis de porfirinas en función de la concentración empleada en células de LCCT. La exposición de las células Myla y Hut 78 al ALA promueve un aumento en la biosíntesis de porfirinas (Mat. y Mét., secciones 6 y 7) en función de la concentración creciente del pro-FS, hasta llegar a un nivel máximo (Figura 2.1). Los valores máximos o plateau se alcanzaron a partir de ALA 0,6 mM y fueron de $48,0 \pm 2,3$ y $45,1 \pm 3,5$ ng porfirinas/ 10^5 cél para Hut78 y Myla, respectivamente. Las curvas de síntesis de porfirinas en función de la concentración de ALA, resultaron similares en ambas líneas.

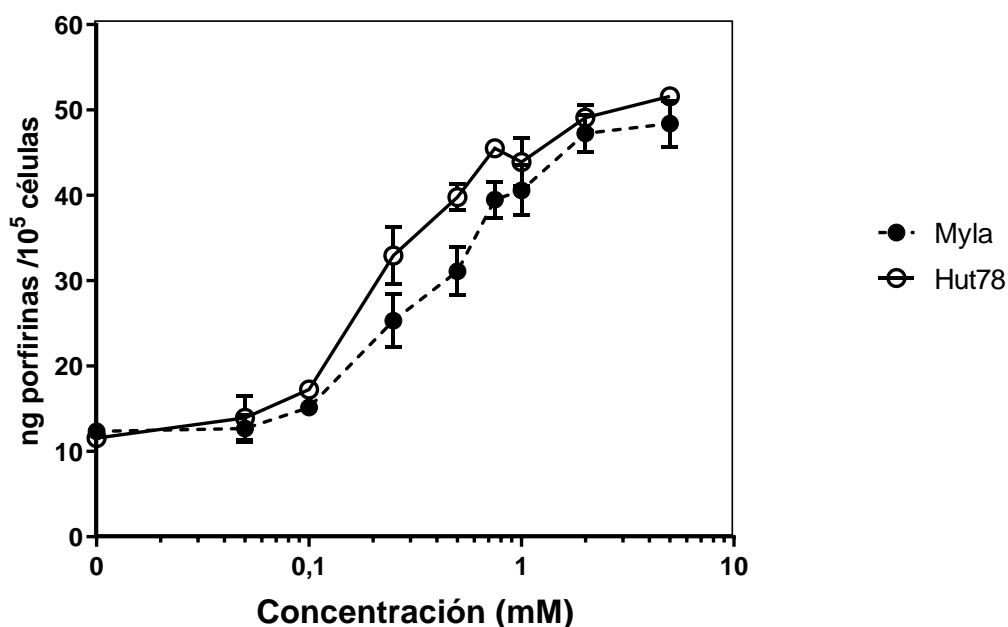


Figura 2.1. Síntesis de porfirinas a partir de ALA en células de LCCT. Las células Myla y Hut78 se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de ALA en medio sin suero durante 3 horas. Los niveles intracelulares de porfirinas fueron determinados fluorométricamente y normalizados a partir del número de células presentes al final del experimento.

2.2. Terapia fotodinámica *in vitro* a partir de ALA

Con el fin de evaluar la respuesta a la TFD, asegurando el nivel máximo de producción de porfirinas, se empleó una concentración de ALA 1 mM, dado que supera la concentración a la cual se alcanza el plateau de porfirinas determinado en la Figura 2.1. Se llevó a cabo la TFD (Mat. y Mét., sección 9) empleando

distintas dosis lumínicas comparando así la respuesta a dicha terapia entre ambas líneas celulares (Figura 2.2). Las DL_{50} fueron de $19,3 \text{ mJ/cm}^2$ para Myla y $20,4 \text{ mJ/cm}^2$ para Hut78, mostrando que ambas líneas tienen similar grado de respuesta a la TFD.

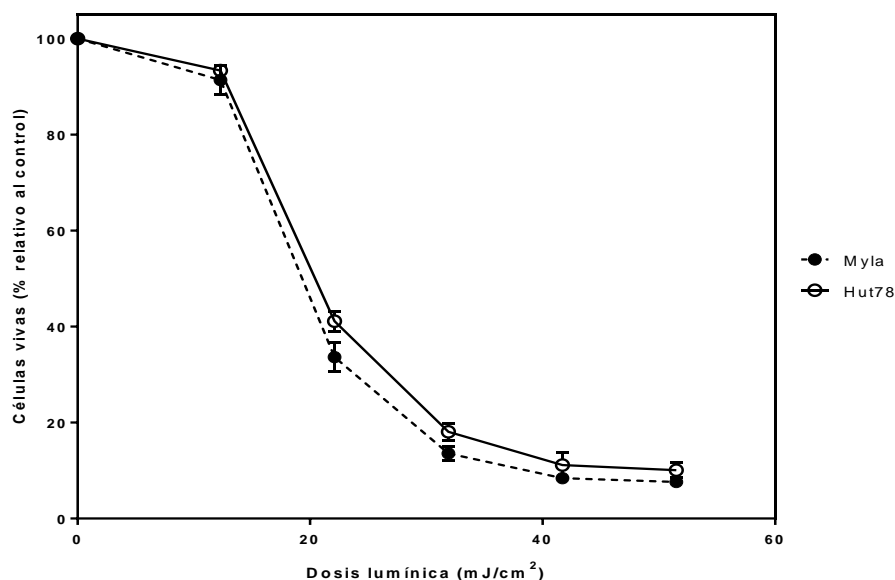


Figura 2.2. Sobrevida celular de las células Myla y Hut78 luego de la TFD. Las células fueron incubadas con ALA 1 mM durante 3 horas, luego de lo cual se realizó la TFD empleando dosis crecientes de luz. Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, expresado como un porcentaje del control de células no irradiadas.

2.3. Síntesis de porfirinas *in vitro* a partir de los ésteres Me-ALA y He-ALA

Con el fin de conocer si los ésteres comerciales de ALA poseen una respuesta diferencial para este modelo *in vitro* de LCCT, se comparó la síntesis de porfirinas a diferentes concentraciones de los ésteres Me-ALA y He-ALA con la obtenida a partir del ALA. La Figura 2.3 muestra la síntesis de porfirinas incubando 3 horas con diferentes concentraciones de los compuestos, utilizando las líneas celulares Myla y Hut78 (Mat. y Mét., secciones 6 y 7). Ambas líneas exhibieron curvas similares de síntesis porfirínica en función de la concentración de los distintos pro-FS empleados para cada compuesto, llegando a los mismos valores máximos de síntesis de porfirinas (condiciones plateau) a distintas concentraciones para cada compuesto.

El derivado Me-ALA muestra un patrón de síntesis de porfirinas similar al obtenido con el ALA en ambas líneas celulares empleadas, encontrándose el valor plateau de síntesis de porfirinas a una concentración de 0,6 mM, de igual modo que con el ALA. Por otra parte, el He-ALA alcanza ese valor máximo de síntesis de porfirinas en ambas líneas a una concentración 12 veces menor que el ALA, es así que este pro-FS produce los valores máximos de porfirinas a una concentración de 0,05 mM.

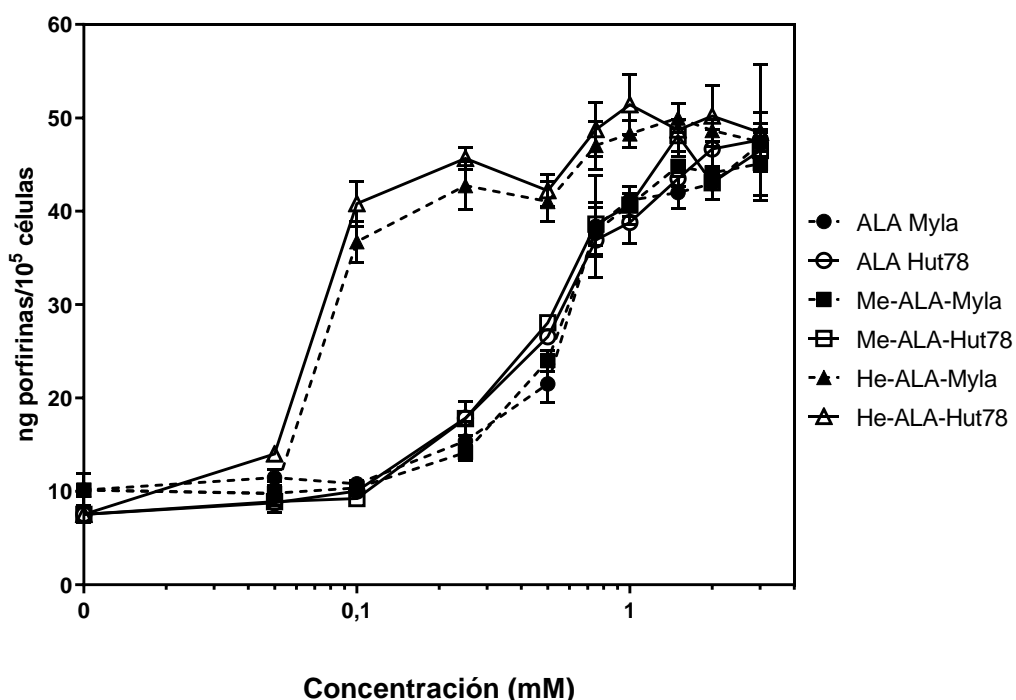


Figura 2.3. Síntesis de porfirinas a partir de ALA, Me-ALA y He-ALA en células Myla y Hut78. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ALA o derivados durante 3 horas, los niveles de porfirinas intracelulares fueron determinados fluorométricamente y normalizados a partir del número de células presentes al final del experimento.

2.4. Terapia fotodinámica *in vitro* a partir de los ésteres Me-ALA y He-ALA

Habiendo determinado en la Figura 2.3 las condiciones óptimas de síntesis porfirínica, en la Figura 2.4 se muestra la respuesta a la TFD (Mat. y Mét. sección 9) de las células Myla y Hut78 a partir de los ésteres de ALA en comparación con el ALA, utilizando una concentración de 0,05 mM la cual es sub-plateau para ALA y Me-ALA y plateau para He-ALA. Bajo estas condiciones, sólo el He-ALA es capaz de generar muerte celular, con una DL_{50} de 17,8 y 18,5 mJ/cm^2 para las líneas Myla y Hut78, respectivamente, mientras que no hubo fotodaño

significativo a partir de ALA y Me-ALA, verificando que la baja producción de porfirinas se traduce en una menor respuesta a la terapia.

Estos datos, al ser comparados con los que surgen de la Figura 2.2, demuestran que a bajas concentraciones de He-ALA (0,05 mM) se obtienen las mismas DL_{50} que al utilizar concentraciones mayores a 0,6 mM de ALA. Lo cual indica que, para este modelo de trabajo, es el He-ALA el compuesto comercial que muestra mejor respuesta a la TFD a bajas concentraciones.

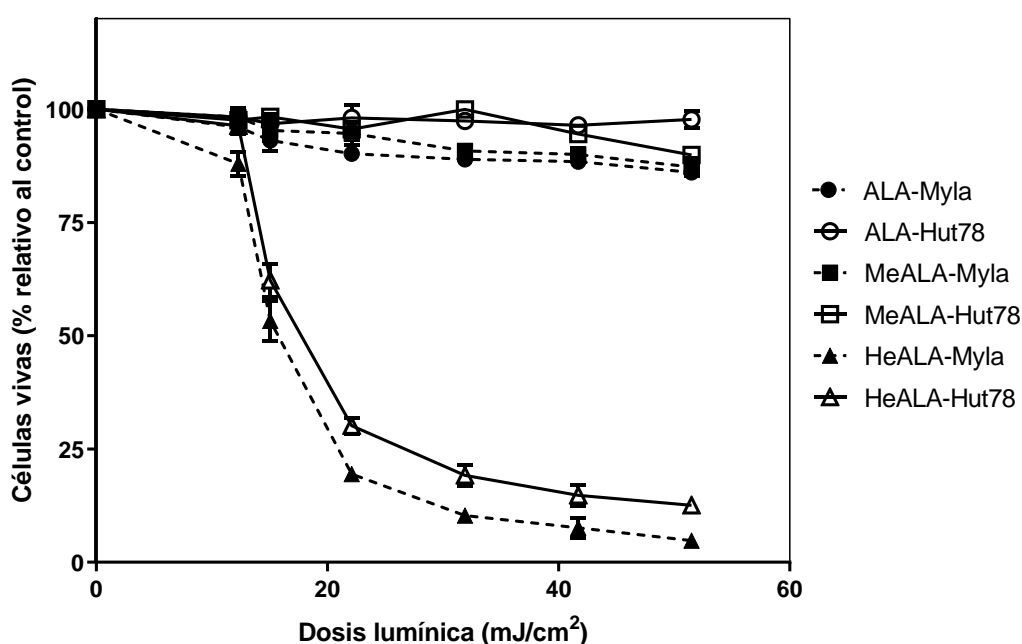


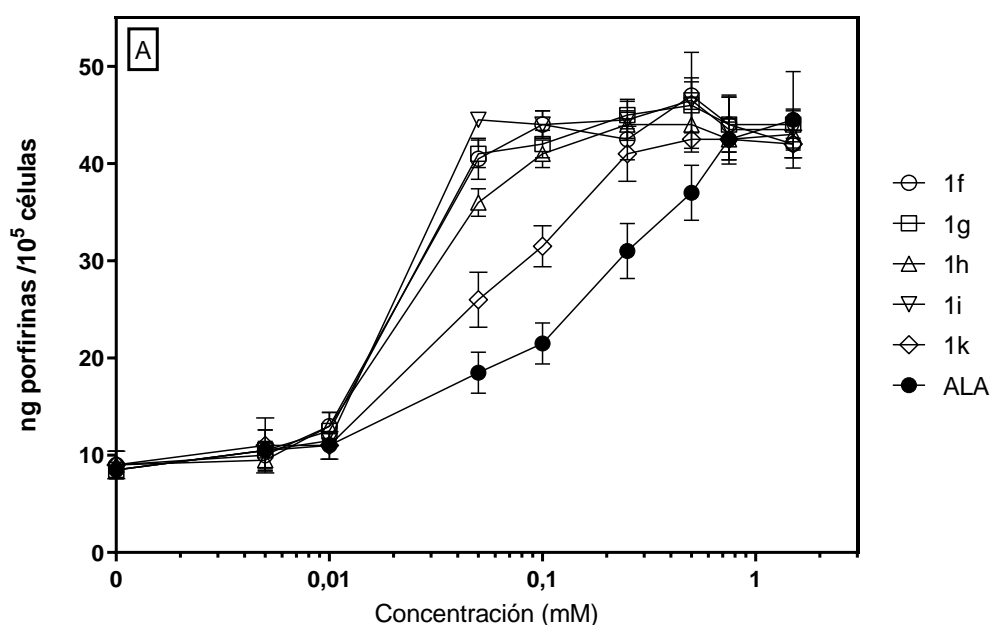
Figura 2.4. Sobrevida celular luego de la TFD empleando ALA, He-ALA y Me-ALA en células Myla y Hut78. Las células fueron incubadas con 0,05 mM de ALA o sus derivados ésteres durante 3 horas luego de lo cual, se realizó la TFD empleando distintas dosis lumínicas. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de MTT, como porcentaje del control de células no irradiadas.

2.5. Síntesis de porfirinas *in vitro* a partir de los conjugados de ALA

A fin de evaluar los nuevos conjugados de ALA y determinar su respuesta a la TFD, en una primera instancia se buscó la concentración óptima para lograr la máxima síntesis de porfirinas. Para ello se analizó la producción porfirínica a partir de los 5 nuevos conjugados denominados 1f, 1g, 1h, 1i e 1k en función de la concentración en ambas líneas celulares de LCCT. Es así que, la Figura 2.5 muestra la biosíntesis de porfirinas en células Myla y Hut78 con períodos de

incubación de 3 h (Mat. y Mét. secciones 6 y 7) en función de la concentración de conjugado empleada.

La cantidad de porfirinas producidas por cada compuesto sigue un perfil similar tanto en el modelo de MF (Myla) como en el de SS (Hut78). Los valores máximos de síntesis de porfirinas se obtuvieron a partir de concentraciones de 0,05 mM para los compuestos 1f, 1g y 1i; 0,1 mM para el compuesto 1h y 0,2 mM para el compuesto 1k. Al comparar estos valores plateau con los de ALA se observa que los conjugados estudiados son entre 3 y 12 veces más eficientes. Al remitir estos resultados a la Figura 2.3, los compuestos 1f, 1g y 1i muestran un valor de concentración para alcanzar el plateau igual al obtenido con He-ALA.



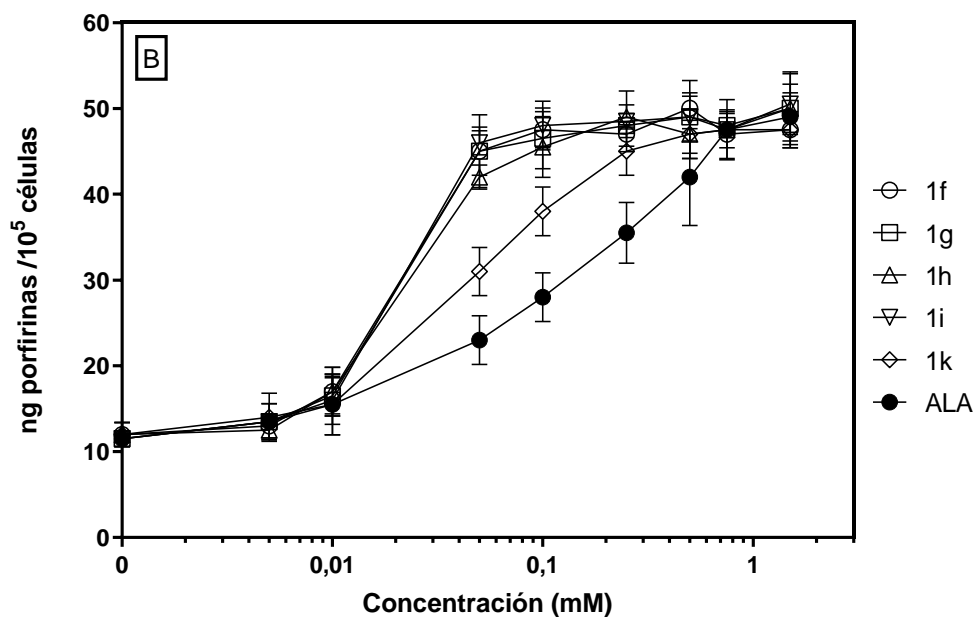


Figura 2.5. Síntesis de porfirinas a partir de los derivados de ALA y en sus derivados 1f, 1g, 1h, 1i y 1k en células Myla (A) o Hut78 (B). Las células se expusieron a diferentes concentraciones de ALA o derivados durante 3 horas. Los niveles de porfirinas intracelulares fueron determinados fluorométricamente y normalizados a partir del número de células presentes al final del experimento.

2.6. Terapia fotodinámica *in vitro* a partir de los nuevos conjugados de ALA

La eficiencia de la TFD (Materiales y Métodos, sección 9) con los conjugados de ALA fue evaluada en células Myla y Hut78, empleando concentraciones de 0,1 mM (Figura 2.6) y 0,25 mM (Figura 2.7). A dichas concentraciones los compuestos se encuentran en condiciones plateau (inducen máxima síntesis de porfirinas), excepto por 1k, cuyo valor se encuentra a 0,25 mM y ALA, que llega a su plateau a condiciones de 0,6 mM.

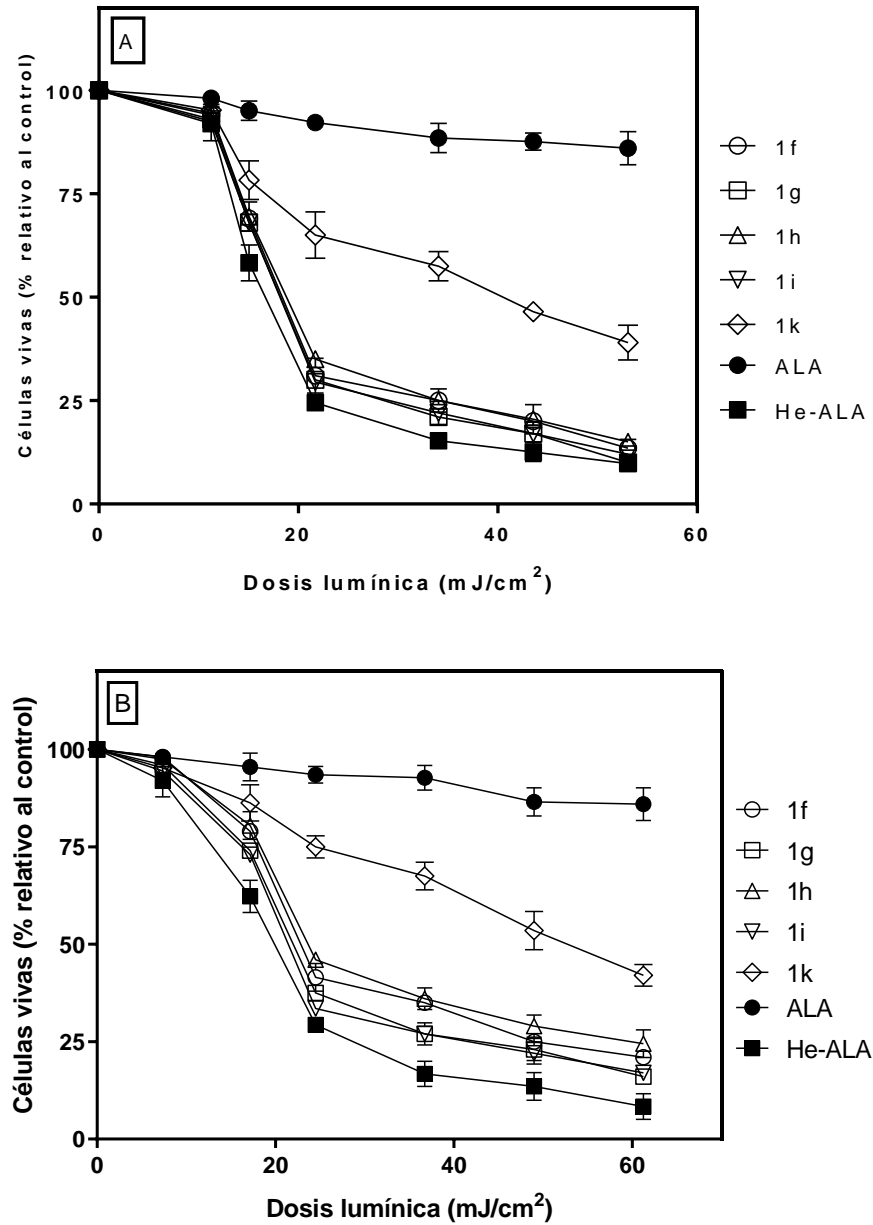


Figura 2.6. Sobrevida celular luego de la TFD empleando ALA, 1f, 1g, 1h, 1i y 1k en células Myla (A) y Hut78 (B). Las células fueron incubadas con 0,1 mM de ALA o sus derivados durante 3 horas luego de lo cual, se realizó la TFD empleando distintas dosis lumínicas. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de MTT, como porcentaje del control de células no irradiadas.

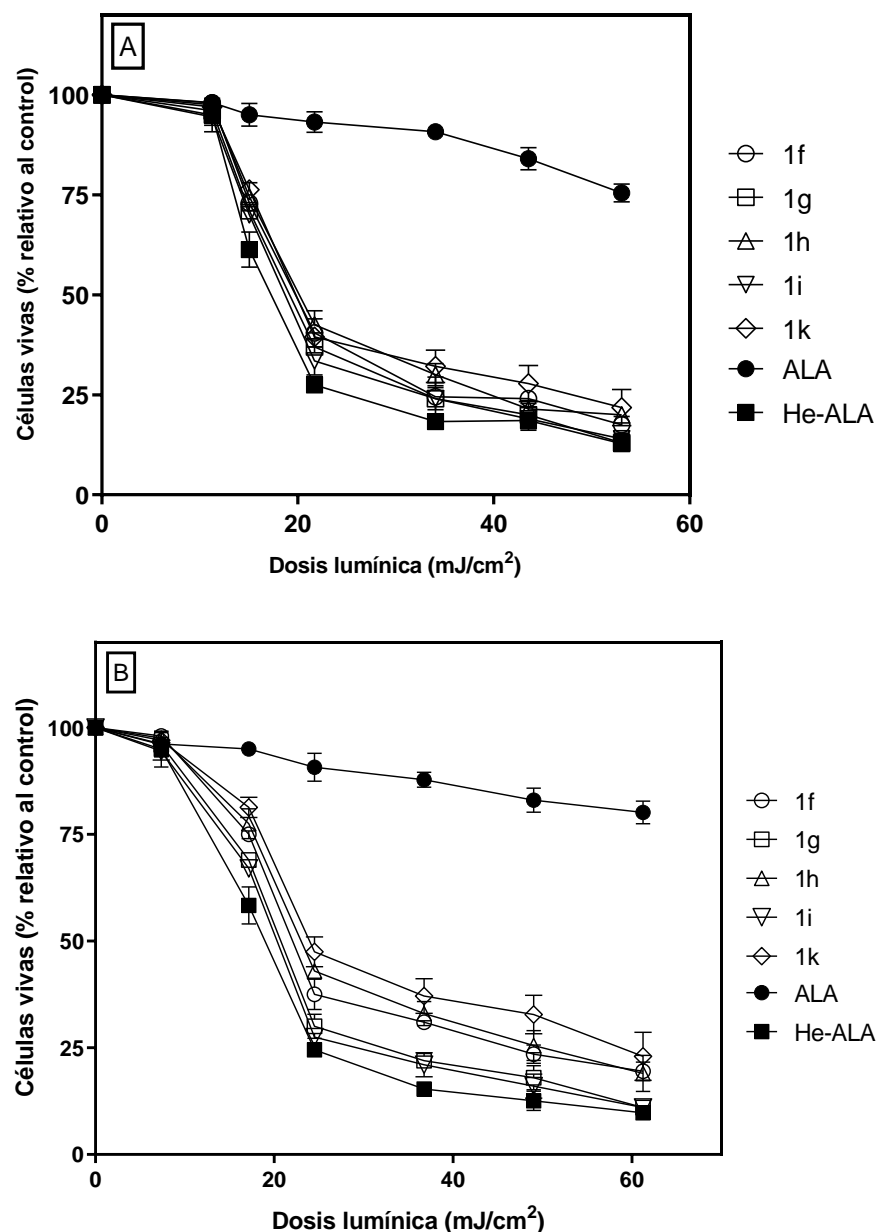


Figura 2.7. Sobrevida celular luego de la TFD empleando ALA, 1f, 1g, 1h, 1i y 1k en células Myla (A) y Hut78 (B). Las células fueron incubadas con 0,25 mM de ALA o sus derivados durante 3 horas luego de lo cual, se realizó la TFD empleando distintas dosis lumínicas. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de MTT, como porcentaje del control de células no irradiadas.

El objetivo de este capítulo fue el de optimizar la ALA-TFD hallando el compuesto que con menor concentración induzca una óptima respuesta fotodinámica, tratando de superar la performance de los derivados comerciales disponibles actualmente en el mercado.

Con el fin de facilitar el análisis de las Figuras 2.6 y 2.7, en la Tabla 2.2 se muestran las DL₅₀ correspondientes a cada conjugado y al He-ALA en ambas líneas celulares. Analizando estos valores, se ve una correlación entre la respuesta a la TFD y la síntesis porfirínica a partir de cada compuesto. Ambas líneas alcanzan un valor máximo similar de porfirinas y en este caso, se traduce en similar respuesta a la TFD. La misma respuesta es alcanzada con ALA en condiciones de máxima síntesis de porfirinas, es decir 0,6 mM (ver LD₅₀ Figura 2.2). Sin embargo, bajo las condiciones analizadas (0,1 y 0,25 mM) el ALA no alcanza el valor de DL₅₀ debido a la baja producción de porfirinas obtenida.

Para Myla y Hut78 en las condiciones estudiadas, todos los compuestos resultaron mejores que el ALA. El elevado rendimiento fotodinámico de los compuestos 1f, 1g y 1i es comparable al del He-ALA en ambas concentraciones estudiadas, siendo estos los más promisorios de los 5 evaluados, para su futura aplicación clínica. Mientras tanto, el compuesto 1k muestra una menor eficiencia en condiciones subplateau (0,1 mM), tal como era esperable.

Tabla 2.2. DL₅₀ calculadas a partir de las Figuras 2.6 y 2.7 para los derivados de ALA en células Myla y Hut78

	Concentración de derivado	DL ₅₀ (mJ/cm ²)					
		He-ALA	1f	1g	1h	1i	1k
Myla	0,1 mM	17,3	18,4	18,3	20,4	19,0	40,7
	0,25 mM	17,8	22,0	22,8	20,1	18,8	19,8
Hut78	0,1 mM	19,9	22,8	22,8	24,7	21,2	51,8
	0,25 mM	18,6	22,2	20,3	23,6	19,7	25,3

2.7 Discusión

En este capítulo se evaluó en células de LCCT la efectividad como pro-FS de la molécula de ALA y los nuevos conjugados de ALA generados a partir de una síntesis basada en reacciones multicomponentes, la cual resulta económica, simple y novedosa. Si bien se ha estudiado el ALA en diferentes líneas de desórdenes linfoproliferativos con buenos resultados *in vitro* (Gamaleia et al., 2008), la mayoría se focalizó en linfomas Hodgkin de estirpe B y hasta el momento se posee poca información acerca del tratamiento de los LCCT empleando ALA-TFD. En una oportunidad, se ha probado clínicamente la TFD en el tratamiento de pacientes con MF luego de la topicación con ALA 20% bajo su forma comercial Levulan[®] (Orenstein, 2000; Edström et al., 2001, 2008) y para el Me-ALA 16,8%

con la crema comercial Metvix[®] (Fernández-Guarino et al., 2010; 2013) lográndose respuestas al tratamiento de entre el 60 al 80%. Estos estudios clínicos, aunque con pocos casos documentados, abrieron el paso al uso de la ALA-TFD en esta patología. Sin embargo, no se ha arribado a un consenso sobre los protocolos terapéuticos (formulación de la droga, concentración, cantidad de sesiones, dosis lumínicas) a emplear en esta patología.

En esta tesis, se realizaron los primeros estudios *in vitro* sobre el uso de ALA y sus derivados en células de LCCT tales como Myla como modelo de MF y Hut78 como modelo de SS.

En primer lugar, se empleó ALA para evaluar los niveles de síntesis de porfirinas, y luego determinar el grado de fotodaño alcanzado utilizando las concentraciones adecuadas. Ambas líneas respondieron a la ALA-TFD generando niveles de porfirinas comparables con los obtenidos en líneas adherentes tales como F3II y LM3 de adenocarcinoma mamario murino (Vallecorsa y Casas, 2014); demostrando una buena respuesta a la TFD y siendo comparables a las observadas en líneas de tumores sólidos experimentales como las de adenocarcinoma mamario murino LM3 (Capítulo 4 de esta tesis). Utilizando concentraciones de ALA de 0,6 mM en la línea LM3 se determinó una DL₅₀ de 23,4 mJ/cm², mientras que con las líneas de Myla y Hut78 se obtuvieron DL₅₀s de 19,3 y 20,4 mJ/cm² respectivamente. Niveles similares de dosis lumínicas se han requerido para fotosensibilizar otras líneas celulares como la PAM212 de queratinocitos normales murinos, o B16-E10 de melanoma humano (Vallecorsa y Casas, 2014, Capítulo 3 de esta tesis).

Previamente, Elouet et al. (1997) había descripto la generación de porfirinas en linfocitos normales humanos, encontrando que, mediante estimulación proliferativa con mitógenos, estos niveles aumentaban considerablemente. Este hecho resulta de relevancia ya que los LCCT contienen un infiltrado concomitante acompañante a los linfocitos T malignos, siendo particularmente los linfocitos B un marcador negativo en la patología (Vallecorsa y Vanzulli, 2012). La eliminación de este componente celular sería una ventaja de la TFD. Por otro lado, nuestro grupo había reportado que eran necesarias DL₅₀s mucho mayores, de 210 mJ/cm² para fotodañar linfocitos murinos normales (Casas et al., 2002).

Por otro lado, la acumulación de porfirinas a partir de ALA había sido reportada en modelos biológicos de varias neoplasias malignas hematopoyéticas, tales como leucemia linfoblástica aguda de células T (T-LBL), leucemia linfoblástica aguda de células B (B-LBL), leucemia de células pilosas, linfoma de Burkitt, linfoma

folicular, leucemia mielógena crónica y leucemia promielocítica (Oka et al., 2018).

Los derivados de ALA comerciales, tanto el Me-ALA como el He-ALA generaron máximos niveles de porfirinas en ambas líneas celulares de LCCT en el rango de concentraciones estudiadas. Particularmente, Me-ALA mostró un perfil de síntesis de porfirinas similar al ALA, mientras que el derivado hexílico fue capaz de generar los niveles máximos de porfirinas empleando concentraciones 12 veces menores que ALA y Me-ALA, demostrando su alta eficacia de fotosensibilización en estas líneas.

En estudios con pacientes con MF, se utilizó el derivado metílico de ALA como tratamiento unilesional de estadio de placa (Zane et al., 2006), y además se emplearon las porfirinas sintetizadas como sondas fluorescentes de seguimiento de la extensión del infiltrado en los estadios tempranos (Fernandez-Guarino et al., 2010), obteniéndose una buena respuesta y excelente resultado cosmético luego de la remisión.

En la evaluación de los nuevos conjugados de ALA en las células de LCCT, se obtuvieron niveles máximos de porfirinas empleando concentraciones de hasta 12 veces menores que los obtenidos con ALA o con el derivado metílico, y comparables al He-ALA. Relaciones similares entre el He-ALA y el ALA se han obtenido en las líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino (Vallecorsa y Casas et al., 2014). La síntesis de porfirinas es dependiente de la concentración de ALA incorporada, y a su vez, los valores de porfirinas alcanzados a cierto tiempo por una línea celular poseen un valor máximo que no se puede sobrepasar por la fina regulación de la ruta metabólica del hemo (Di Venosa et al., 2005, 2006).

Comparando específicamente cada derivado, podemos observar que, si bien el valor máximo de porfirinas alcanzado es dependiente de cada línea celular y del tiempo de incubación, la concentración a la cual se alcanza dicho plateau de porfirinas es dependiente de cada compuesto. En ese sentido podemos definir como más eficaces aquéllos que alcanzan dicho valor a una concentración menor, a partir de ello es que se estableció el siguiente orden de eficiencia entre los compuestos estudiados en este capítulo: $1i = 1g = 1f > 1h > 1k$. Estos nuevos derivados de ALA (1f, 1g, 1h, 1i, 1k y otros generados bajo la misma metodología de síntesis) fueron previamente evaluados en otras líneas celulares, tales como IGROV-1 de carcinoma de ovario, HaCaT de queratinocitos humanos inmortalizados y LM2 de adenocarcinoma mamario murino (Gola et al., 2016). A concentraciones de 0,6 mM, los valores máximos de síntesis de porfirinas obtenidos fueron similares en orden de magnitud a los hallados para Myla y

Hut78, excepto para la línea HaCaT que resultó ser menor productora de porfirinas.

Los ensayos de TFD para los nuevos derivados demostraron que, utilizando concentraciones suficientes de ALA y derivados para garantizar un máximo nivel de porfirinas, se obtiene una respuesta fotodinámica muy buena, comparable con la del He-ALA. En los estudios de Gola et al. (2016) se demostró que en la línea LM2, los compuestos 1i y 1h fueron los más prometedores. Más aún, el compuesto 1k fue, al igual que en este capítulo, el que menor eficiencia demostró.

Todos los nuevos derivados de ALA diseñados y testeados en este capítulo, poseen un residuo N-fenilacetamida sustituido (Gola et al., 2016). Las diferencias entre los distintos compuestos radican en el tipo de sustituyente en el anillo (Tabla 2.1). Los compuestos 1f y 1g contienen un sustituyente en posición *para*, siendo estos un flúor y un metilo respectivamente. Los compuestos 1h y 1k poseen un sustituyente en posición *orto*, el cual es un trifluorometano y un metilo respectivamente. Finalmente, el compuesto 1i posee dos sustituyentes, un metilo en posición *orto*, y un bromo en posición *para*. El aporte de estos sustituyentes en el ingreso a la célula no se encuentra elucidado; sin embargo, a través del análisis de los logD es posible estimar su carácter hidrofílico o lipofílico.

Un valor negativo de logD significa que el compuesto posee más afinidad por la fase acuosa, es decir que es más hidrofílico; cuando logD es igual a 0 significa que el compuesto se encuentra igualmente particionado entre la fase acuosa y la lipídica; mientras que cuando el logD es positivo, denota una mayor afinidad del compuesto por la fase lipídica, es decir que es más lipofílico.

En orden de hidrofobicidad creciente (logD): 1f (-0,45) < 1g (-0,082) = 1k (-0,082) < 1h (0,28) < 1i (0,69). En comparación con el ALA (-3,45) y el Me-ALA (-1,51), todos resultan con un carácter mayor de hidrofobicidad; siendo el 1i, que fue el más efectivo en LCCT, comparables con el He-ALA (0,71), compuesto más efectivo en la TFD reportado hasta el momento y utilizado en clínica.

Sin embargo, no se logró hallar una correlación directa entre el valor de logD y la eficacia del como pro-FS en la TFD, aunque todos los compuestos evaluados son más lipofílicos que la molécula de ALA. Este hecho se pone en evidencia al comparar los compuestos isómeros 1g y 1k que poseen igual logD y, sin embargo, poseen diferente eficiencia como pro-FS, lo que sugiere que otros factores estructurales distintos a la lipofilicidad deben jugar un rol en su actividad biológica.

En cuanto a la estructura química, si bien la N-fenilacetamida incorporada al ALA beneficia la capacidad del pro-FS, parecería ser determinante la posición del sustituyente del grupo benceno, posiciones *para*- los volverían más promisorios, mientras que los sustituyentes *orto*- disminuirían su capacidad fotodinámica, y entre ellos la presencia de halógenos podría favorecer el ingreso de estas moléculas o bien la acción enzimática para liberar el ALA. Esto podría proporcionar un lineamiento para diseñar nuevos compuestos que optimicen aún más la terapia.

En relación a las líneas celulares Myla y Hut78, se ha observado un comportamiento similar en relación a la síntesis de porfirinas y la eficacia en la TFD con todos los compuestos evaluados. La línea Hut78 muestra ser levemente mejor productora de porfirinas, sin embargo, al evaluar la respuesta a la TFD resulta ligeramente menos respondedora, alcanzando la DL_{50} con mayores dosis lumínicas (15-25% más que la línea Myla). Ambas líneas son linfocitos T, lo cual estaría indicando que existen mecanismos compensatorios en relación a la generación de fotodaño. Los mecanismos de resistencia atribuidos a la TFD, o más precisamente a los FS, son compartidos con los mecanismos generales de resistencia a drogas como quimioterápicos y radioterápicos, y pueden ser atribuidos a: (a) tasas diferentes de captación o eflujo del FS, (b) tráfico intracelular alterado del FS, (c) disminución de la actividad del FS, y (iv) aumento de la inactivación del FS (Casas et al., 2015).

Cuando ocurre la fotoactivación del FS, se forman ROS y durante la primera etapa aumenta la inactivación de las especies citotóxicas a través de las enzimas antioxidantes (Henderson et al., 1992; Gomer et al., 1996). Además, las proteínas de shock térmico juegan un rol de chaperonas intracelulares para otras proteínas, plegando y asistiendo en la estabilidad de su conformación, previniendo un plegamiento no deseado y ayudando a estabilizar proteínas parcialmente dañadas (Shackley et al., 2002) y así ayudar a reponer el daño causado por la TFD. En un segundo paso luego del fotodaño, ocurre un aumento en la reparación del daño inducido a proteínas, membranas y aún ADN. En esta misma etapa, se induce a nivel génico, una respuesta de estrés luego de que ocurrió la TFD, resultando en la modulación de la proliferación e inducción de las vías de supervivencia, además de otras múltiples vías de señalización extracelular (Ruhdorfer et al., 2007).

Más allá de este punto, la eficacia de la ALA-TFD en las líneas LCCT ha quedado evidenciada lográndose fotosensibilizaciones comparables a las obtenidas en tumores experimentales sólidos de otras patologías (Vallecora y Casas, 2014). Esto, sumado a la localización cutánea de la patología, la vuelve un blanco

sumamente prometedor. Las terapias tradicionales para los LCCT abarcan la radioterapia y el uso de quimioterápicos (antraciclinas o análogos de nucleósidos), los cuales proveen respuestas terapéuticas de corta duración (Zinzani et al, 2000, Wollina et al, 2003, Bloom et al., 2012). La fotoféresis extracorpórea (FEC) es una modalidad *ex vivo* que utiliza la exposición de células tumorales, extraídas de sangre del paciente, a un fármaco derivado del psoraleno, con la subsiguiente irradiación con rayos UV-A. Esta combinación daña el ADN de las células del LCCT, que luego son readministradas al paciente, contribuyendo a inducir una respuesta inmunitaria en el cuerpo. Sin embargo, esta técnica requiere repetir el proceso varias veces y a su vez carece de selectividad, con lo cual daña en la misma medida a glóbulos blancos normales. La modalidad de régimen combinado entre fotoféresis, interferón y retinoides es utilizada con muy buena tolerancia. Holien et al. (2018) combinaron la FEC con la administración de ALA en células de pacientes con SS y enfermedad de injerto contra huésped, y observaron que la producción de porfirinas fue mayor en células T activadas con CD25+ que en células T en reposo. Las células T CD4+ y CD8+ tratadas con ALA/UV-A fueron más afectadas que las tratadas con psoraleno/UV-A. Esto abre el camino al reposicionamiento del ALA en la FEC, así como también a la potencialidad de sus derivados, como los evaluados en esta tesis evaluados. Previamente Akita et al. (2007) describió con éxito la combinación de ALA y PUVA utilizando el psoraleno 8-MOP.

Como conclusión, este estudio es uno de los primeros trabajos donde se reporta el éxito de la ALA-TFD *in vitro* en células de Linfomas Cutaneos de Células T. Se ha demostrado además que tanto el derivado comercial He-ALA como los nuevos conjugados de ALA con residuos benzamida son una herramienta muy atractiva para el tratamiento de esta patología. Este estudio demuestra el potencial de la TFD en la patología, y la necesidad de encontrar nuevos pro-FS en busca de optimizar la TFD y ampliar sus aplicaciones.

2.8 Referencias

- AKITA, Y, et al. The effect of psoralen plus ultraviolet A in vitro in HUT-78 enhances by 5-aminolevulinic acid. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2007, vol. 23, no 2-3, p. 95-97.
- BLOOM, T, et al. Cutaneous T-cell lymphomas: a review of new discoveries and treatments. *Current treatment options in oncology*, 2012, vol. 13, no 1, p. 102-121.
- CASAS, A, et al. Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *British journal of cancer*, 1999, vol. 80, no 10, p. 1525.

CASAS, A, et al. Mechanisms of resistance to photodynamic Therapy: an update. En *Resistance to photodynamic therapy in cancer*. Springer, Cham, 2015. p. 29-63.

CASAS, A, et al. Photodynamic therapy of activated and resting lymphocytes and its antioxidant adaptive response. *Lasers in medical science*, 2002, vol. 17, no 1, p. 42-50.

DI VENOSA, G, et al. Photodynamic therapy: regulation of porphyrin synthesis and hydrolysis from ALA esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, vol. 83, no 2, p. 129-136.

DI VENOSA, G, et al. Sensitivity to ALA-PDT of cell lines with different nitric oxide production and resistance to NO cytotoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2005, vol. 80, no 3, p. 195-202.

EDSTRÖM, DM, et al. Long-term follow-up of photodynamic therapy for mycosis fungoides. *Acta dermato-venereologica*, 2008, vol. 88, no 3, p. 288-290.

EDSTRÖM, DW, et al. Photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for mycosis fungoides: clinical and histological response. *Acta dermato-venereologica*, 2001, vol. 81, p. 184-188.

ELÉOUET, S, et al. Delta-aminolevulinic acid-induced fluorescence in normal human lymphocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1997, vol. 41, no 1-2, p. 22-29.

FERNANDEZ-GUARINO, M, et al. Plaque-phase mycosis fungoides treated with photodynamic therapy: results from 12 patients. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 2010, vol. 101, no 9, p. 785-791.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M, et al. Terapia fotodinámica en micosis fungoides. *Actas dermo-sifiliograficas*, 2013, vol. 104, no 5, p. 393-399.

FOTINOS, N, et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochemistry and photobiology*, 2006, vol. 82, no 4, p. 994-1015.

GAMALEIA, NF, et al. Sensitivity of normal and malignant human lymphocytes to 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic damage. *Experimental oncology*, 2008.

GOLA, G, et al. Synthesis of chemically diverse esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy via the multicomponent Passerini reaction. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no 92, p. 89492-89498.

GOMER, C, et al. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer research*, 1996, vol. 56, no 10, p. 2355-2360.

HENDERSON, B, et al. How does photodynamic therapy work?. *Photochemistry and photobiology*, 1992, vol. 55, no 1, p. 145-157.

HOLIEN, T, et al. Comparison between 8-methoxypsoralen and 5-aminolevulinic acid in killing T cells of photopheresis patients ex vivo. *Lasers in surgery and medicine*, 2018.

OKA, T, et al. Metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy. *Scientific reports*, 2018, vol. 8, no 1, p. 14979.

ORENSTEIN, A, et al. Photodynamic therapy of cutaneous lymphoma using 5-aminolevulinic acid topical application. *Dermatologic surgery*, 2000, vol. 26, no 8, p. 765-770.

- RUHDORFER, S, et al. Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *International journal of oncology*, 2007, vol. 30, no 5, p. 1253-1262.
- SHACKLEY, D, et al. Comparison of the cellular molecular stress responses after treatments used in bladder cancer. *BJU international*, 2002, vol. 90, no 9, p. 924-932.
- VALLECORSÁ P, CASAS A. *Usos de Derivados de ALA y Nanopartículas en el Tratamiento Fotodinámico del Cáncer*. En: AIN LUCIANA Informes Finales: Segunda Cohorte Becarios de Formación Inicial en Investigación en Cáncer (2012-2013). Buenos Aires: Instituto Nacional Cáncer (Msal). 2014. ISBN 978-987-45494-2-6.
- VALLECORSÁ P, VANZULLI S. *Estudio de las poblaciones linfoides acompañantes “no neoplásicas” y de las células neoplásicas en Linfomas Cutáneos Primarios de Células T: correlación con los parámetros de progresión*. En: AIN LUCIANA Informes Finales: Primer Cohorte Becarios de Formación Inicial en Investigación en Cáncer (2011-2012). Buenos Aires: Instituto Nacional Cáncer (Msal). 2013. p87 - 93.
- WILLEMZE, R, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, 2005, vol. 105, no 10, p. 3768-3785.
- WOLLINA, U, et al. Multicenter study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2003, vol. 98, no 5, p. 993-1001.
- ZANE, C, et al. Photodynamic therapy with methylaminolevulinate as a valuable treatment option for unilesional cutaneous T-cell lymphoma. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 2006, vol. 22, no 5, p. 254-258.
- ZINZANI, PL, et al. Value of gemcitabine treatment in heavily pretreated Hodgkin's disease patients. *Haematologica*, 2000, vol. 85, no 9, p. 926-929.

CAPÍTULO 3

Estudio de dos nuevos derivados peptídicos de ALA

La incorporación de residuos aminoácidos o ésteres a la molécula de ALA resulta una estrategia atractiva para mejorar la incorporación intracelular de la misma. Estas modificaciones proponen optimizar sus propiedades físico-químicas y lograr tanto una mejor incorporación, como una liberación selectiva del ALA en una línea celular determinada (Casas et al., 1999; Berger et al., 2000, 2003; Rogers et al., 2005). En este sentido, una vez que la célula incorpora esta molécula, el ALA puede ser liberado mediante la acción de esterasas y de proteasas citoplasmáticas (Giuntini et al., 2009). Siguiendo este enfoque, Giuntini y colaboradores sintetizaron una variedad de derivados peptídicos de ALA, los cuales a pH fisiológico no presentan carga, y son más lipofílicos que el ALA, manteniendo sin embargo, una adecuada solubilidad en agua y resultando estables a pH fisiológico.

En este capítulo, el objetivo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* las propiedades de dos nuevos derivados peptídicos de ALA (Figura 3.1) seleccionados del trabajo de Giuntini et al. (2009). Estos derivados son producto de la unión peptídica de un aminoácido N-acetilado con un éster metílico de ALA: Leucinil ALA (Ac-Leu-ALA-Me) y Fenilalanil ALA (Ac-Phe-ALA-Me). Para tal fin, en primer lugar se analizó *in vitro* la síntesis de porfirinas y la respuesta fototóxica al compararlos con ALA libre. Para ello, se utilizaron dos líneas de queratinocitos no tumorales/tumorales: PAM212 y PAM212-Ras, como modelos *in vitro*; y de adenocarcinoma mamario LM2, como modelo *in vivo* de un tumor subcutáneo. La elección de las líneas para los trabajos *in vitro* se debió a la disponibilidad de un modelo de par tumoral/no tumoral, mientras que la línea de adenocarcinoma LM2 fue inoculada de manera subcutánea como modelo de un tumor superficial, ya que se trata de un modelo singénico y no requiere del uso de ratones nude.

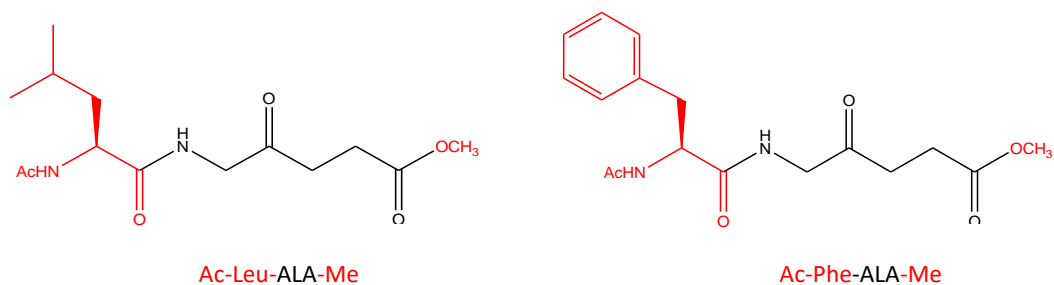


Figura 3.1. Estructura química de los derivados peptídicos de ALA.

3.1. Síntesis de porfirinas en cultivos *in vitro*

Para comenzar, se evaluó la síntesis de porfirinas (Mat. y Mét., sección 6 y 7) a partir de ALA y sus derivados peptídicos en la línea parental PAM212 y la tumoral PAM212-Ras, incubando 3 y 24 h.

Al cabo de 3 h de incubación con los compuestos (Figura 3.2), los derivados alcanzaron los niveles más altos de porfirinas utilizando concentraciones menores que ALA.

Empleando 0,01 mM de Ac-Phe-ALA-Me se obtuvieron $6,1 \pm 0,2$ y $6,6 \pm 0,5$ ng porfirinas/ 10^5 céls para PAM212 y PAM212-Ras respectivamente. La cantidad de porfirinas obtenidas a partir de 0,01 mM de Ac-Leu-ALA-Me fueron de $4,8 \pm 0,4$ y $6,0 \pm 0,4$ ng porfirinas/ 10^5 células para PAM212 y PAM212-Ras, correspondientemente. Ambos compuestos mostraron mayor síntesis de porfirinas al compararlos con ALA a la misma concentración ($2,3 \pm 0,2$ PAM212 y $2,6 \pm 0,2$ ng porfirinas/ 10^5 céls para PAM212-Ras), las cuales fueron comparables con el nivel basal de porfirinas.

Para comparar la eficiencia en la síntesis de porfirinas se utilizó el mejor derivado éster de ALA de uso clínico el hexil-aminolevulinato (He-ALA). La síntesis de porfirinas más eficiente fue obtenida a partir de Ac-Phe-ALA-Me, siendo ésta mejor aún que a partir del He-ALA, el cual indujo $4,9 \pm 0,3$ y $5,7 \pm 0,6$ ng porfirinas/ 10^5 céls para PAM y PAM-Ras, respectivamente, a la misma concentración de 0,01 mM.

Con los derivados peptídicos de ALA se obtuvieron valores de plateau de síntesis de porfirinas en un rango de concentraciones entre 0,01 y 0,05 mM, mientras que con He-ALA se alcanzaron los mismos valores a una concentración mayor de 0,05 mM y con ALA a 0,5 mM.

Los valores de porfirinas alcanzados con PAM212-Ras fueron mayores que los obtenidos con la línea no tumoral, para todas las concentraciones evaluadas e indistintamente del compuesto usado.

Al incubar las células 24 h con los compuestos, se observó un perfil de síntesis de porfirinas similar a la incubación con 3 h, pero con niveles de síntesis de porfirinas mayores, superando las 100 y las 175 ng porfirinas/ 10^5 células para PAM212 y PAM212-Ras respectivamente. Ya sea con ALA o con los derivados

de ALA, la cantidad de porfirinas formadas por la línea transfectada con Ras es significativamente más alta que en la línea parental.

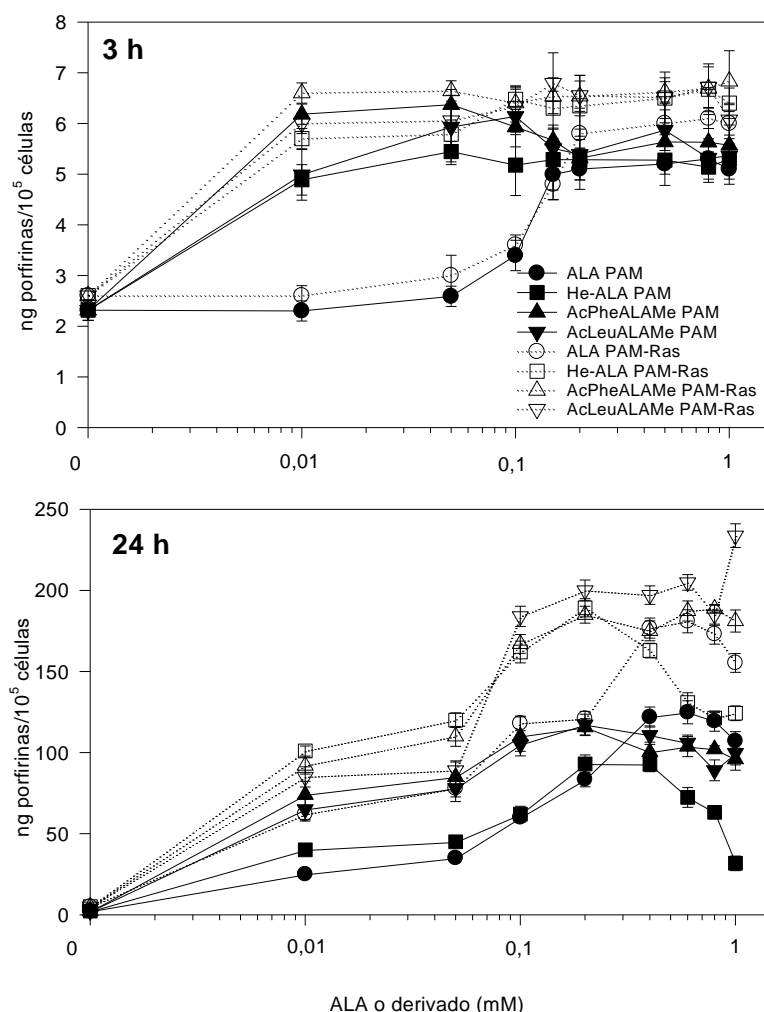


Figura 3.2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA o derivados de ALA en células PAM212 y PAM212-Ras. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ALA o derivados de ALA durante 3 o 24 h. Los niveles intracelulares de porfirinas fueron determinados fluorométricamente y normalizados a partir del número de células presentes al final del experimento.

3.2. Terapia fotodinámica *in vitro*

La Figura 3.3 muestra los resultados de la TFD (Mat. y Mét. Sección 9), realizada luego de 3 h de incubación con las prodrogas a 0,01 mM; con esta concentración se alcanzó el valor plateau para los derivados peptídicos de ALA, no así para He-ALA. Bajo estas condiciones, no se produce fototoxicidad a partir de ALA, mientras que para todos los derivados peptídicos, las DL_{50} fueron de alrededor de

135 mJ/cm² para PAM212-Ras y de 45 mJ/cm² para PAM212, mostrándose una mayor resistencia por parte de la línea tumoral.

Utilizando concentraciones plateau tanto para ALA como para los derivados (1 mM), se observa que para la línea PAM212-Ras, las DL₅₀ fueron de entre 41-45 mJ/cm² para todos los compuestos, en tanto que para la línea parental PAM212 el Ac-Phe-ALA-Me y el He-ALA produjeron un fotodaño mayor, alcanzando DL₅₀ de 19 y 23 mJ/cm² respectivamente. Estos valores de dosis letales son significativamente más altos que los obtenidos con ALA y Ac-Leu-ALA-Me.

De manera coincidente con la síntesis de porfirinas, la respuesta a la terapia fotodinámica resulta ser más efectiva cuando se alcanza el valor plateau de porfirinas, mostrando una relación directa entre la fototoxicidad y la producción de porfirinas, comparando los cuatro compuestos con la misma línea celular.

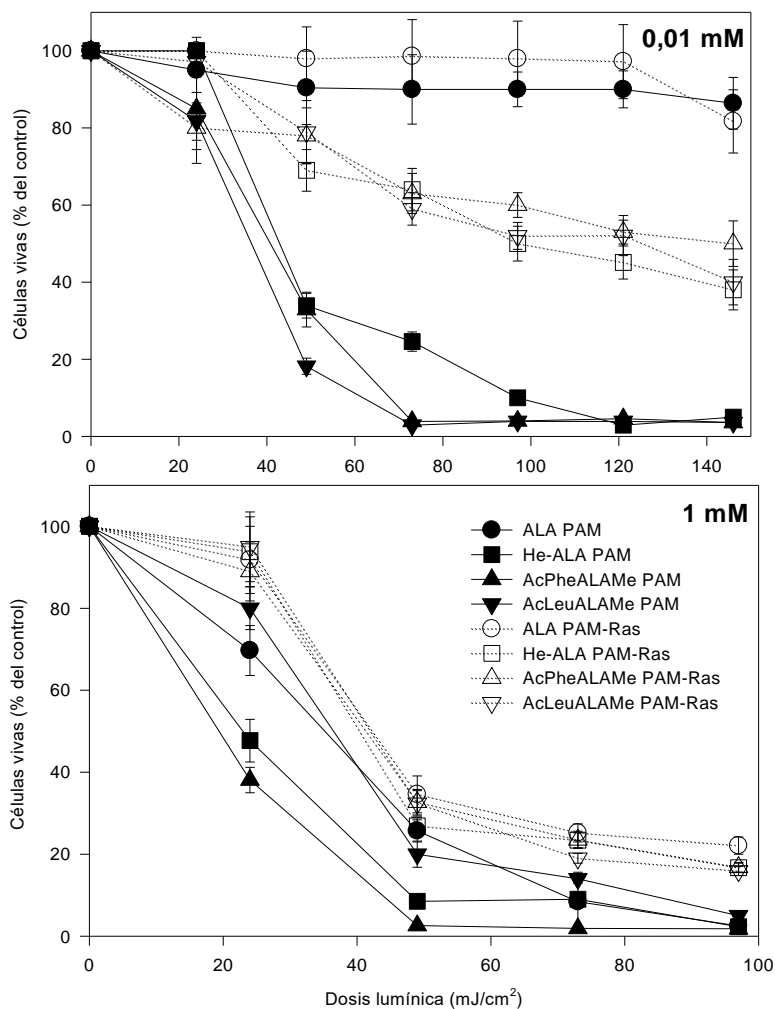


Figura 3.3. Sobrevida celular luego de la TFD. Las células fueron incubadas con 0,01 o 1 mM de ALA o derivados durante 3 h. Luego de lo cual, se realizó la TFD. La viabilidad celular fue evaluada por el ensayo de MTT, como porcentaje del control de células no irradiadas.

3.3 Ensayo *in vivo* tópico: síntesis de porfirinas

Comenzando con los estudios *in vivo*, se utilizó una fibra óptica acoplada a un fluorómetro (Mat. y Mét., sección 14, 15 y 16) para analizar la producción de porfirinas en función del tiempo, a partir del seguimiento de la fluorescencia, luego de la administración tópica de ALA (3 mg) y de sus derivados peptídicos, sobre la piel adyacente al tumor (PAT) de ratones implantados subcutáneamente con el tumor LM2 (Figura 3.4). La cantidad de ALA a aplicar se determinó a partir de la cantidad mínima que lleva a una detección de fluorescencia significativa en el tumor de acuerdo a estudios previos del grupo (Perotti et al., 2003).

El ALA induce en la PAT un perfil de producción de porfirinas en el tiempo similar a la de la piel distante. Esto puede ser consecuencia de una rápida difusión de la molécula inmediatamente luego de la aplicación. Por otro lado, aunque Ac-Phe-ALA-Me induce menores cantidades de porfirinas que ALA en ambas áreas, resulta ser más selectivo para la zona tumoral, a lo largo de todo el período de tiempo evaluado. La relación entre PAT y piel distante a lo largo de todo el tiempo estudiado es de 1,45 para Ac-Phe-ALA-Me, lo cual muestra algún tipo de selectividad del derivado peptídico por el sitio de aplicación.

En cuanto al Ac-Leu-ALA-Me, resultó menos efectivo para la generación de porfirinas, produciendo niveles 4 veces menores que los obtenidos con ALA, y no presentando diferencias estadísticamente significativas entre la PAT y la piel distante.

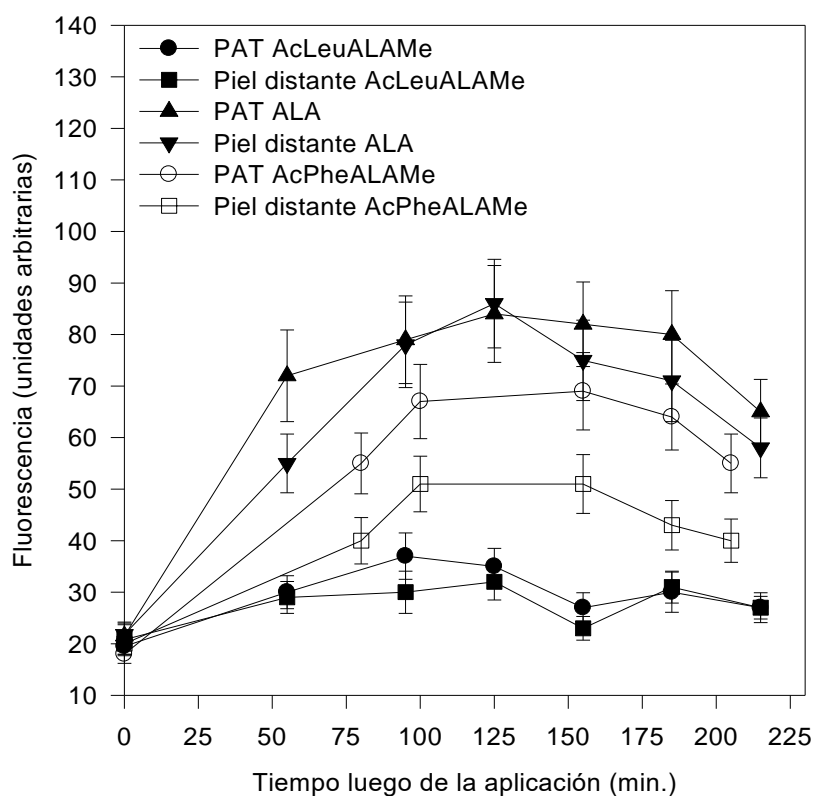


Figura 3.4. Síntesis de porfirinas en la PAT y piel distante luego de la aplicación tópica de ALA y derivados de ALA en un tumor LM2 subcutáneo. El ALA (3 mg) y los derivados peptídicos en dosis equivalentes (6,4 y 7 mg para el derivado leucinil y fenilalanil ALA respectivamente) fueron aplicados tópicamente en la PAT. Mediante una fibra óptica acoplada a un fluorómetro se monitoreó la producción de porfirinas generadas a lo largo del tiempo. La determinación fue hecha sobre la PAT y el área de la piel distante. Se muestra el promedio de tres ratones por tratamiento.

La Tabla 3.1 describe la cantidad de porfirinas extraídas a partir del tumor, la PAT y la piel distante al tumor luego de 3 h de la aplicación tópica de los compuestos. Este tiempo fue determinado como el máximo a partir de los resultados obtenidos en la Figura 3.4. Las porfirinas se cuantificaron luego de la extracción química con HCl 5% mediante detección fluorométrica (Materiales y Métodos, sección 18).

Tabla 1. Acumulación de porfirinas luego de aplicación tópica de ALA y sus derivados peptídicos en un tumor LM2 subcutáneo

	Tumor	PAT	Piel distante
ALA	0,21 ±0,03	0,54±0,09	0,44±0,13
AcLeuALAMe	0,14±0,01*	0,25±0,03*	0,12±0,04*
AcPheALAMe	0,21±0,03	0,44±0,09	0,22± 0,04*

Síntesis de porfirinas (µg porfirinas/g tejido) determinada luego de extracción química en tumor, piel tumoral (PAT) y piel distante al sitio de aplicación El ALA (3 mg) y los derivados peptídicos (6,4 y 7 mg para el derivado leucinil y fenilalanil ALA respectivamente) fueron aplicados tópicamente en la PAT a dosis equivalentes de ALA, y se sacrificaron los animales luego de 3 h. *p< 0,05 comparado con el mismo tejido tratado con ALA.

Si bien la cantidad de porfirinas extraídas en la PAT y en el tumor son similares para ALA y para Ac-Phe-ALA-Me, los valores obtenidos en la piel distante son significativamente menores para el derivado (p=0,046), corroborando que éste posee una mayor selectividad por la localización tumoral.

Por otro lado, los tres tejidos producen significativamente menos porfirinas a partir de Ac-Leu-ALA-Me en comparación con ALA, sin ningún incremento en la selectividad.

3.4 Distribución de porfirinas en piel luego de la aplicación tópica de ALA y sus derivados peptídicos

La Figura 3.5 muestra la biodistribución de porfirinas en la PAT luego de la aplicación tópica de ALA y Ac-Phe-ALA-Me (Mat. y Mét., sección 19). Aunque la fluorescencia de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA es típicamente mayor en la epidermis y los folículos pilosos, la distribución a partir del derivado muestra ser menos marcada en la epidermis, observándose una fuerte acumulación en los folículos pilosos.

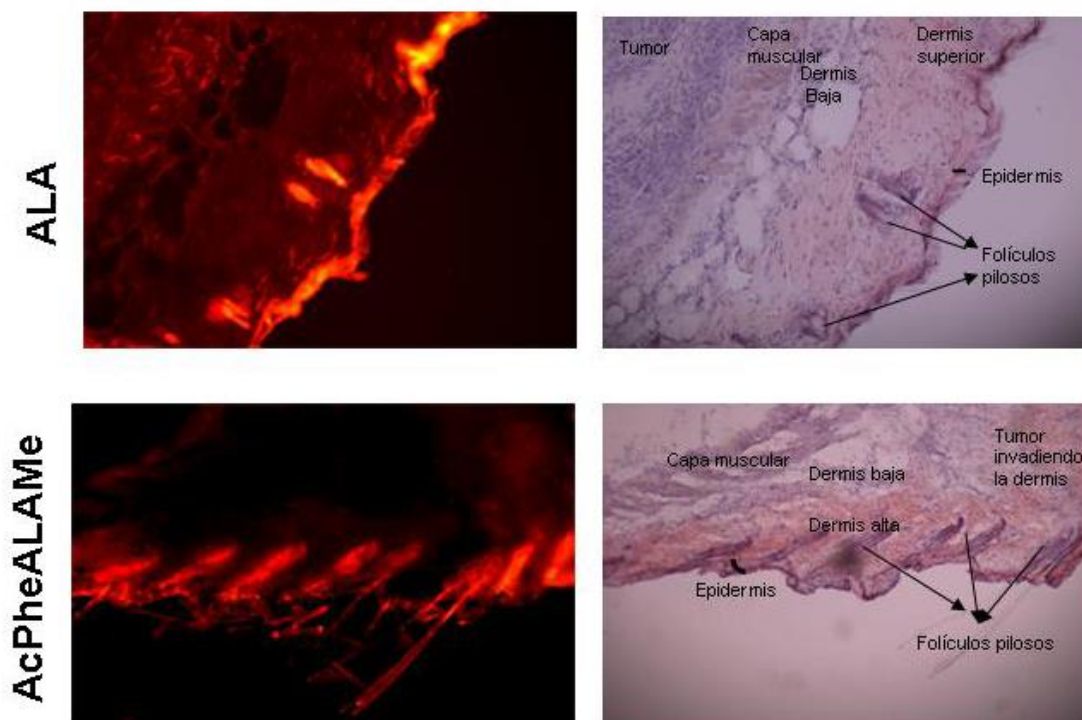


Figura 3.5. Imágenes de microscopía de fluorescencia y tinciones con hematoxilina y eosina de las PAT y tumores tratados con ALA y Ac-Phe-ALA-Me. El ALA y los derivados peptídicos fueron aplicados tópicamente en la PAT a dosis equimolares de ALA 3 mg. Los animales fueron sacrificados 3 h después de la aplicación. Las secciones se fotografiaron con un objetivo 10X.

3.5 Biodistribución sistémica de porfirinas

La Figura 3.6 muestra la cinética de la síntesis de porfirinas en diferentes tejidos, luego de la aplicación sistémica de los compuestos, 120, 257,2 y 281,6 mg/kg de ALA, leucinil y fenilalanil ALA respectivamente (Mat. y Mét., sección 18).

En la mayoría de los tejidos, el máximo de síntesis de porfirinas se alcanza entre la primera y la quinta hora luego de la administración de la prodroga. El hígado es el único tejido que no eliminó completamente las porfirinas generadas luego de las 24 h. En términos de máxima acumulación de porfirinas, el Ac-Phe-ALA-Me produce los valores más altos en todos los tejidos analizados, siendo de alrededor de un 20% mayores que para el derivado Ac-Leu-ALA-Me. En términos generales, riñón e intestino son los mejores productores de porfirinas, mientras que el cerebro es el órgano que produce menor cantidad. Con respecto a la selectividad, ninguno de los derivados peptídicos logró incrementar los niveles de porfirinas tumorales en relación a la piel o algún otro órgano evaluado.

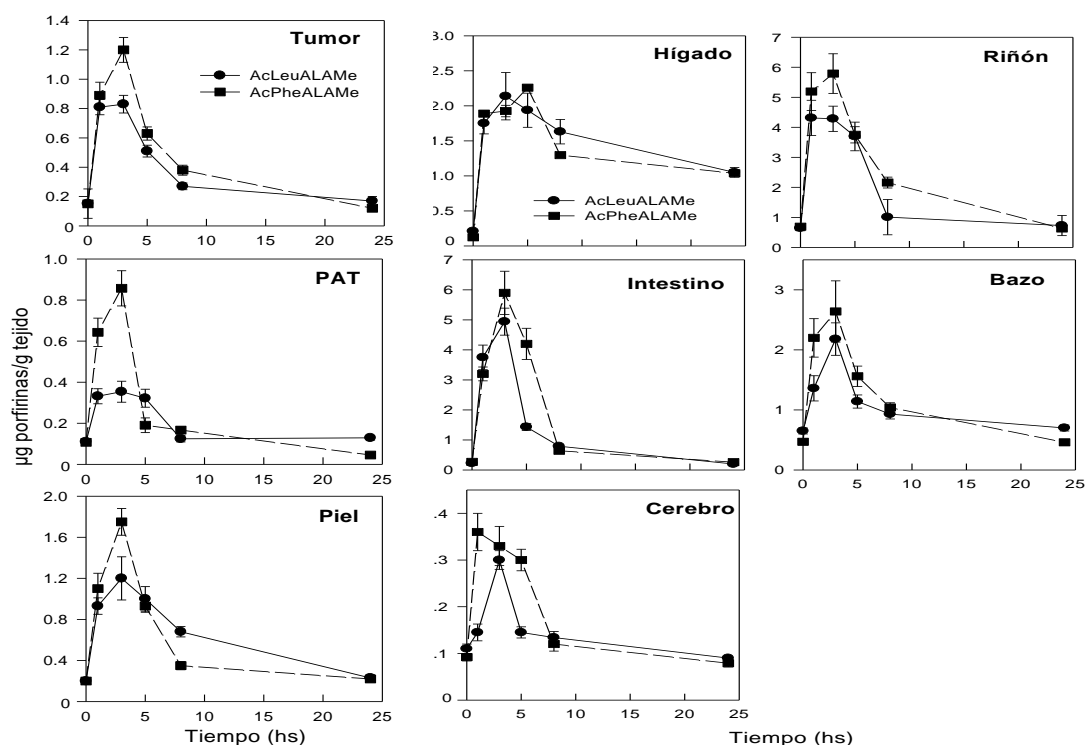


Figura 3.6. Cinética de síntesis de porfirinas en tejidos luego de la administración de Ac-Leu-ALA-Me y Ac-Phe-ALA-Me intraperitoneal (i.p.). Ac-Leu-ALA-Me y Ac-Phe-ALA-Me fueron inyectados i.p utilizando dosis equivalentes a 120 mg/kg de ALA y, luego de diferentes tiempos, las porfirinas fueron extraídas a partir de tejido y cuantificadas. Se emplearon 3 animales para cada punto.

La Figura 3.7 muestra una comparación de la síntesis de porfirinas entre todos los tejidos luego de 3 h de la administración sistémica de los derivados en dosis equivalentes a 40 y 120 mg/kg de ALA. Ac-Phe-ALA-Me indujo significativamente más porfirinas en el tumor en comparación con ALA y Ac-Leu-ALA-Me ($p=0,0005$ y $p=0,0006$) a 120 mg/kg, mientras que en la PAT y la piel distante, la cantidad fue similar a la alcanzada con ALA. La cantidad de porfirinas inducidas por el derivado leucínico es similar a la de ALA con 120 mg/kg tanto para tumor como para piel distante, sin embargo es significativamente menor para PAT ($p=0,018$). Para el resto de los tejidos evaluados, la síntesis es similar para los tres compuestos.

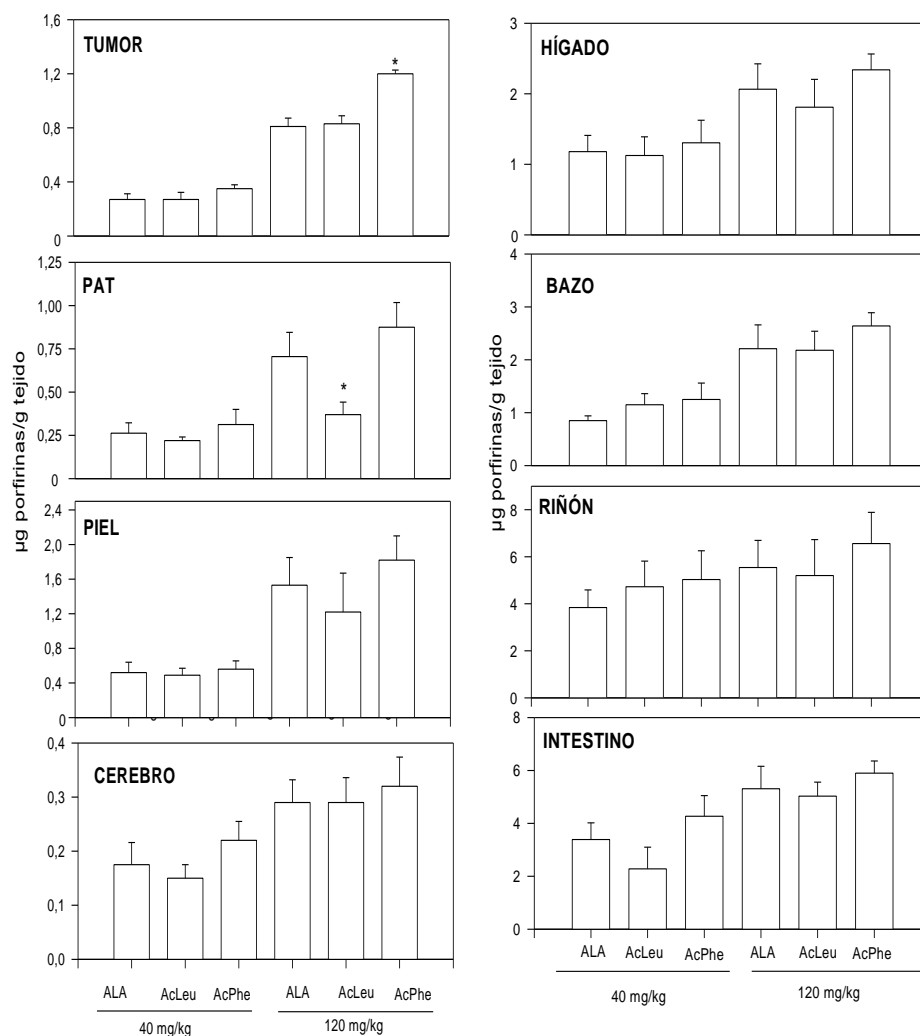


Figura 3.7. Comparación de la síntesis de porfirinas en tejidos a partir de ALA y sus derivados peptídicos ALA luego de su aplicación sistémica. Tanto Ac-Leu-ALA-Me como Ac-Phe-ALA-Me fueron administrados i.p en dosis equivalentes a 40 y 120 mg/kg de ALA. Las porfirinas fueron extraídas químicamente de los tejidos y se determinaron 3 h después de la inyección. Se emplearon 3 ratones por cada punto. *, $p < 0,05$ en comparación con ALA.

3.6 Terapia fotodinámica *in vivo*

La Figura 3.8 muestra el corte histológico y tinción con hematoxilina y eosina (Mat. y Mét., sección 20), de un tumor subcutáneo LM2 topicado con ALA y Ac-Phe-ALA-Me, y tratado con TFD (Mat. y Mét., sección 21), fijado 24 h después del tratamiento. A nivel histológico, la respuesta a la TFD no muestra grandes diferencias entre el ALA y su derivado en cuanto al tipo de estructura dañada. El estrato córneo de la piel se encuentra parcial o completamente separado de la epidermis; además se observa la presencia de células picnóticas,

independientemente de la prodroga utilizada. Dentro de la dermis, las fibras de colágeno parecen engrosadas y se observa presencia de fibrosis y edema.

Las células grasas en el tejido subcutáneo se encuentran desorganizadas y se evidencia daño en los folículos pilosos, preservándose la musculatura cutánea intacta. La epidermis, no así la dermis, parece más preservada en la muestra tratada con el derivado peptídico en comparación con la tratada con ALA.

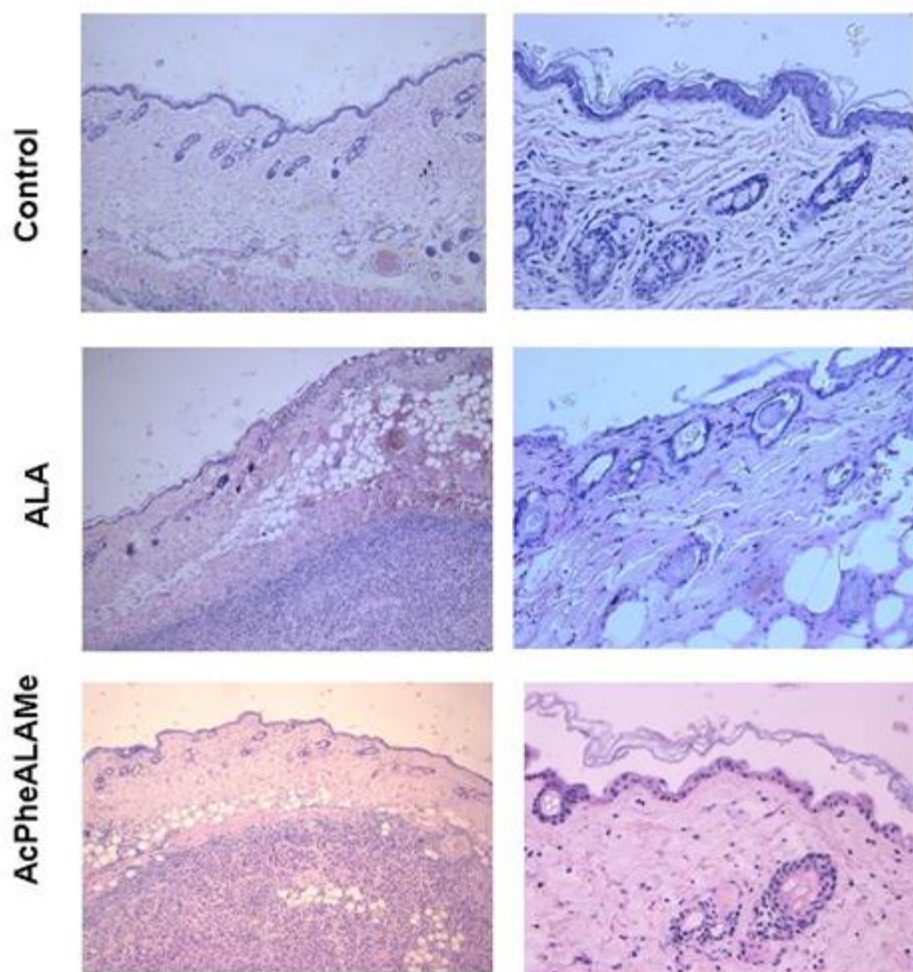


Figura 3.8. Imágenes de la PAT y tumor tratadas tópicamente con ALA o Ac-Phe-ALA-Me-TFD y teñidas con hematoxilina y eosina. El ALA y el Ac-Phe-ALA-Me se aplicaron tópicamente sobre la PAT a dosis equivalentes de 3 mg de ALA, 3 h después se iluminaron con un láser de 635 nm. Los tumores más las PAT adyacentes tratados fueron fijados 24 h después del tratamiento. Las secciones fueron fotografiadas utilizando objetivos 10X (izquierda) y 40X (derecha). Los controles fueron ratones iluminados sin la aplicación de las prodrogas.

3.7 Discusión

En la reciente historia del desarrollo de derivados del ALA se ha descrito la síntesis y evaluación de derivados peptídicos de ALA, en los cuales ya sea el grupo amino o carboxílico terminal han sido unidos a grupos funcionales, promoviendo así mejoras en las propiedades fisicoquímicas de la molécula y en su potencial para la liberación específica de ALA en diferentes líneas celulares, de acuerdo a las peptidasas o esterases que estas expresan (Casas et al., 1999; Berger et al., 2000, 2003; Rogers et al., 2005; Giuntini et al., 2009). Sin la mediación de estas enzimas resulta imposible la generación endógena de las porfirinas fotosensibilizadoras, de las cuales la protoporfirina IX (PpIX) es la principal actora.

La línea celular PAM212-Ras sintetiza más porfirinas a partir de ALA al compararla con su línea parental sin transfectar. Sin embargo, resulta más resistente a la TFD, particularmente cuando se utilizan bajas concentraciones del pro-FS. Esta característica ha sido previamente observada para la línea celular de mama HB4a y su transfectada HB4a-Ras (Rodríguez et al., 2007), corroborando que la sobreexpresión del oncogen Ras confiere resistencia a la TFD mediada por ALA, independientemente de la cantidad de porfirinas sintetizadas.

Las proteínas de la familia Ras son un grupo de interruptores moleculares en una variedad de rutas de señalización que controlan procesos tales como la integridad del citoesqueleto, la proliferación, la adhesión celular, la apoptosis y la migración celular. Son GTPasas de bajo peso molecular ubicadas en la cara interna de la membrana plasmática. Mutaciones en genes de esta familia como HRas, NRas y KRas ocurren con variada frecuencia en diferentes tipos de tumores, tal que entre el 20% y 30% de todos los tumores humanos presentan este oncogén (Bos et al., 1989; Rodríguez-Viciano et al., 2005). Se ha reportado que la transformación de células con genes Ras provoca cambios a nivel morfológico, en los tiempos de duplicación así como también en la expresión de aminopeptidasas y antígenos específicos de la línea parental (Buick et al., 1987; Bhagwat et al., 2003).

En este estudio los ensayos *in vitro*, han mostrado que los derivados de ALA resultan más eficientes que el propio ALA en la TFD, induciendo los mismos niveles de muerte celular pero con una concentración 50-100 veces menor. Utilizando concentraciones de 0,01 mM, al comparar con ALA, la cantidad de porfirinas sintetizadas es de 2 y 3 veces más alta para Ac-Leu-ALA-Me y Ac-Phe-ALA-Me, respectivamente. Cabe destacar que estos derivados peptídicos muestran mayor síntesis de porfirinas que el éster de ALA más estudiado hasta el

momento y aprobado por la FDA (He-ALA), generando los mismos valores plateau de porfirina con una concentración 5 veces menor. Esta ventaja en la producción de porfirinas podría deberse a una internalización más rápida y eficiente de los compuestos en comparación con el He-ALA.

Utilizando concentraciones bajas de los compuestos (0,01mM), las DL₅₀ fueron de alrededor de 135 mJ/cm² para PAM212-Ras y de 45 mJ/cm² para la línea parental, mientras que para esas concentraciones el ALA no generó fotodaño.

En el estudio complementario *in vivo*, usando células de carcinoma mamario murino LM2 para generar tumores subcutáneos en ratones BALB/c, se obtuvieron resultados que muestran que la aplicación tópica del derivado Ac-Phe-ALA-Me es más selectiva que ALA por la zona tumoral. Sin embargo, la administración sistémica no muestra cambios en la selectividad. Es necesario aclarar que las concentraciones utilizadas para ambos derivados peptídicos, no producen ninguna toxicidad en los ratones en ninguna de las dos vías de aplicación utilizadas.

A través de una fibra óptica acoplada a un equipo detector de fluorescencia se analizó la producción de porfirinas, luego de la aplicación tópica de ALA y sus derivados, observándose que el ALA induce una rápida difusión de las porfirinas hacia sitios distantes, no ocurriendo esto con el uso de los derivados peptídicos. El mismo comportamiento había sido reportado para He-ALA (Casas et al., 2001).

Estudios previos de ALA aplicado sobre papilomas murinos mostraron que la cantidad de porfirinas sintetizadas a partir de ALA era la misma en los papilomas topicados y en los papilomas distantes no topicados, demostrando que, el ALA y/o las porfirinas producidas, se pueden distribuir a través de la vasculatura y acumular en tumores distantes. Aunque es probable que ALA sea una molécula que difunde a sitios distantes, no es posible descartar la contribución de los precursores hidrofóbicos de PpIX tales como uroporfirina y coproporfirina (Kennedy et al., 1992; Moan et al., 2001; Landes et al., 2018).

Por otro lado, cuando se realizó el mismo estudio sobre papilomas utilizando He-ALA, la síntesis de porfirinas resultó más baja en los papilomas distantes en relación a los topicados, demostrando que el éster y/o las porfirinas sintetizadas se hallan más selectivamente localizadas en el sitio de aplicación. De manera similar, Peng (1996) administró cremas con ALA y otros ésteres de ALA (metil, etil, y propil) sobre piel de ratón normal y por medio de detección por fluorescencia, se hallaron porfirinas sólo en zonas donde se aplicaron los derivados ésteres; mientras que luego de aplicar ALA, se detectó fluorescencia

tanto en el sitio de aplicación como en áreas distantes. Estas prodrogas de ALA aplicadas tópicamente pueden ser retenidas por el estrato córneo de la piel, el cual puede actuar como reservorio (Rougier y Lotte, 1986), a partir del cual pueden difundir, generando un patrón de acumulación de las porfirinas dependiente de la distancia desde el sitio de aplicación.

En cuanto a las nuevas prodrogas estudiadas, es posible que la modificación éster (metil) en los derivados peptídicos sea la responsable de la acumulación de la fluorescencia en el sitio de aplicación en comparación con ALA. A su vez, se observa un confinamiento en el sitio de aplicación al utilizar ésteres de ALA y ésteres peptídicos de ALA, demostrando que ALA, y no las porfirinas, son posiblemente las principales moléculas que se distribuyen a través del torrente sanguíneo. En cuanto a la biodistribución, Ac-Phe-ALA-Me parece ser menos retenido por la epidermis, pero penetra a la dermis. Los compuestos o vehículos más lipofílicos penetran más profundo a través de la piel en comparación con los compuestos más hidrofílicos (Singh et al., 1999; Dokka et al., 2005). Además, este patrón de distribución de la PpIX se correlaciona con el fotodaño producido luego de la irradiación. En cuanto a los cambios histológicos observados luego de la irradiación, el daño dérmico y la profundidad de necrosis tumoral alcanzada, resultaron similares al usar ALA o Ac-Phe-ALA-Me, aunque el daño epidérmico parece ser leve en las PAT tratadas con el derivado peptídico.

No se observaron diferencias en cuanto a la síntesis de porfirinas en la PAT utilizando ALA o los derivados peptídicos, sin embargo existe una selectividad del Ac-Phe-ALA-Me por el tumor y la PAT con respecto a la piel distante, debido a que se obtuvo una menor distribución en sitios distantes a través de la piel y la vasculatura tumoral. Esto resulta sumamente importante, debido al efecto secundario de fotosensibilidad cutánea inducida por el ALA (Juzenas y Juzeniene, 2010).

La baja toxicidad del ALA libre al ser administrada sistémicamente convierte a la ALA-TFD en una terapia promisorio. De igual modo, no se ha observado toxicidad en ratas Wistar al administrar los derivados de ALA aquí testeados por vía endovenosa con dosis de 100 mg/kg (Casas et al., 1999). Por el contrario, se ha reportado que los ésteres de ALA conteniendo cadenas alifáticas largas, como el He-ALA, no pueden ser administrados vía sistémica debido a su alta toxicidad (Patrice et al., 2003). Perotti et al. (2002), han atribuido la toxicidad de los ésteres lipofílicos de ALA a la habilidad de cruzar la barrera hematoencefálica, induciendo así neurotoxicidad. A su vez, en dicho trabajo, luego de la administración i.p. de He-ALA, la síntesis de porfirinas en todos los órganos y en

el tumor fue baja en comparación con el ALA. Luego de la administración sistémica de los derivados peptídicos de ALA, en esta tesis se ha encontrado que luego de 3 h, se obtienen $1,22 \pm 0,15$ y $0,81 \pm 0,09$ ng porfirinas/g tumor para Ac-Phe-ALA-Me y Ac-Leu-ALA-Me respectivamente; mientras que luego de dosis equivalentes de He-ALA (Perotti et al., 2002), la cantidad de porfirinas acumuladas fue de $0,3 \pm 0,02$ ng porfirinas/g, un valor apenas mayor que el nivel basal tumoral.

Trabajos previos han demostrado que Ac-Phe-ALA-Me y Ac-Leu-ALA-Me resultaron eficientes en la síntesis de porfirinas en la línea PAM212 y en explantes de piel de cerdo (Giuntini et al., 2009; Bourré et al., 2009). La terminación N-acetil parecería jugar un rol importante en el proceso metabólico, permitiendo la producción de porfirinas a partir de este tipo de compuestos, mientras que bloqueando el C terminal con un éster metilo se logra un efecto mayor (Bourré et al., 2008). Utilizando siRNA para disminuir la expresión de la acil péptido hidrolasa (APEH), ha sido posible mostrar la implicancia de esta enzima, miembro de la familia de las serin peptidasas, en la liberación de ALA a partir de estos derivados peptídicos N-acetilados (Bourré et al., 2009). Se ha mostrado también que la APEH se expresa en varios tejidos normales, tales como, eritrocitos, hígado, testículo, intestino, riñón y cerebro; pero su actividad biológica precisa se desconoce (Kobayashi y Smith, 1987; Erlandsson et al., 1991; Fujino et al., 2000; Yamin et al., 2007). A su vez, la expresión de las peptidasas sería diferente entre líneas celulares o tejidos normales y tumorales (Schoenberger et al., 1986); por lo cual inhibidores de las aminopeptidasas han sido diseñados como blanco contra el cáncer (Aozuka et al., 2004; Mauriz et al., 2010; Mucha et al., 2010).

Las diferencias que se han encontrado *in vivo* entre Ac-Phe-ALA-Me y Ac-Leu-ALA-Me, pueden ser atribuidas a su mayor habilidad de cruzar barreras biológicas, como por ejemplo difusión pasiva a través de la piel, luego de la administración tópica, gracias a su gran lipofilicidad (logD -0,66 vs. -1,10; Giuntini et al., 2009). En el caso de la aplicación sistémica, niveles diferenciales de la actividad peptidasa para cada tejido podrían significar una mejor eficiencia en la liberación de ALA a partir de Ac-Phe-ALA-Me comparada con el derivado leucinil, en tejidos tales como tumor, hígado, piel y riñón. El bajo rendimiento del Ac-Leu-ALA-Me cuando es administrado tópicamente sugiere que existe un grado óptimo de lipofilicidad para los pro-FS de este tipo, la cual es requerida para cruzar efectivamente barreras biológicas como la piel. Probablemente el uso de diferentes vehículos podría mejorar la penetración de este derivado para su aplicación en TFD.

En trabajos previos, ha sido demostrado por nuestro grupo colaborador inglés, que tanto Ac-Phe-ALA-Me como Ac-Leu-ALA-Me penetran más fácilmente las células PAM212 que el ALA (Bourré et al., 2008; Giuntini et al., 2009) y que la captación de los derivados peptídicos de ALA a las células están parcialmente impulsados por el transporte pasivo, mientras que para He-ALA, el cual es más lipófilico la entrada a la célula es principalmente pasiva (Bourré et al., 2008).

Los derivados Ac-Leu y Ac-Phe-ALA demostraron ser aún mejores productores de porfirinas que el Ac-Met-ALA-Me (Bourré et al., 2009). Más aún, la eficiencia en la liberación del ALA a partir de leucinil ALA y fenilalanil ALA parece coherente con las preferencias de las APEH en relación a sus sustratos e inhibidores, las cuales favorecen a los sustratos N-acetilados con residuos de aminoácidos hidrofóbicos y, pequeñas moléculas inhibitorias con sustituyentes aromáticos como imitadores de cadenas laterales. Por ejemplo, se demostró que Ac-Phe-OH inducía una inhibición del 69% de APEH, en comparación con una inhibición de 42% y 46% inducida por sus sustratos naturales Ac-ALA-OH y Ac-Met-OH (Driessen et al., 1985), mientras que Leu-p-nitroanilida es un sustrato eficiente para las APEHs de mamíferos (Palmieri et al., 2011).

La principal aplicación clínica de la ALA-TFD ha sido el tratamiento de lesiones cutáneas del tipo no melanoma, principalmente para carcinoma basocelular con aplicación tópica, aunque también se ha investigado el tratamiento de displasia de alto grado en la patología del esófago de Barrett, en la neoplasia cervical y en el cáncer de cavidad oral (Barnett et al., 2003; Pech et al., 2005; Mallia et al., 2010). La administración de ALA también ha sido empleada en la resección guiada por fluorescencia de cáncer de vejiga, y lesiones intraepiteliales de cuello de útero, pulmón y cerebro (Kennedy et al., 1996; Dindyal et al., 2008; Guyon et al., 2012; Nokes et al., 2013; Stummer et al., 2006). La TFD se puede aplicar virtualmente a cualquier tipo de cáncer localizado que sea accesible por una fibra óptica, sin embargo aunque la TFD constituye una terapia importante en dermatología, la dificultad de orientar la vehiculización del ALA ha obstaculizado hasta ahora el traslado de la ALA-TFD hacia más aplicaciones oncológicas. Los resultados, aportados por nuestro grupo, sobre la acumulación de porfirinas después de la administración i.p de derivados peptídicos de ALA sugieren que el Ac-Phe-ALA-Me aplicado sistemáticamente alcanza cada órgano analizado y se acumula particularmente en el tejido tumoral. Por otro lado, los resultados de aplicación tópica destacan la capacidad del derivado fenilalanil ALA de ser confinado en el área de aplicación, de atravesar el estrato córneo y alcanzar la dermis y el tejido tumoral adyacente, con dispersión mínima a tejidos distantes. Aunque actualmente se carece de modelos de cáncer de piel animal que se asemejen a los

tumores humanos, el modelo de tumor implantado subcutáneo, utilizado en este trabajo, proporciona una importante primera impresión de la eficacia de los derivados peptídicos de ALA, antes de su posible traslado hacia aplicaciones clínicas.

En conclusión, los resultados de este estudio proporcionan más evidencia de que la conjugación de ALA con aminoácidos específicos es un enfoque prometedor para el aumento en la inducción de la producción de porfirinas intracelulares para la TFD. A su vez los estudios *in vivo* apoyan la posibilidad de utilizar particularmente Ac-Phe-ALA-Me tanto para el tratamiento tópico de carcinomas cutáneos como para la administración sistémica. La realización de un ajuste químico adicional al esqueleto de la prodroga debería producir compuestos adicionales para mejorar la ALA-TFD con potencial traslación al campo clínico.

3.8 Referencias

- AOZUKA, Y, et al. Anti-tumor angiogenesis effect of aminopeptidase inhibitor bestatin against B16-BL6 melanoma cells orthotopically implanted into syngeneic mice. *Cancer letters*, 2004, vol. 216, no 1, p. 35-42.
- BARNETT, A, et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of photodynamic therapy using 5-aminolaevulinic acid for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *International journal of cancer*, 2003, vol. 103, no 6, p. 829-832.
- BERGER, Y, et al. Ethylene glycol and amino acid derivatives of 5-aminolevulinic acid as new photosensitizing precursors of protoporphyrin IX in cells. *Journal of medicinal chemistry*, 2000, vol. 43, no 25, p. 4738-4746.
- BERGER, Y, et al. Evaluation of dipeptide-derivatives of 5-aminolevulinic acid as precursors for photosensitizers in photodynamic therapy. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2003, vol. 11, no 7, p. 1343-1351.
- BHAGWAT, S, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*, 2003, vol. 101, no 5, p. 1818-1826.
- BOURRE, L, et al. 5-Aminolaevulinic acid peptide prodrugs enhance photosensitization for photodynamic therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 2008, vol. 7, no 6, p. 1720-1729.
- BOURRE, L, et al. Protoporphyrin IX enhancement by 5-aminolaevulinic acid peptide derivatives and the effect of RNA silencing on intracellular metabolism. *British journal of cancer*, 2009, vol. 100, no 5, p. 723.
- BUICK, R, et al. Activated H-ras transforms rat intestinal epithelial cells with expression of α -TGF. *Experimental cell research*, 1987, vol. 170, no 2, p. 300-309.
- CASAS, A., et al. Comparative effect of ALA derivatives on protoporphyrin IX production in human and rat skin organ cultures. *British journal of cancer*, 1999, vol. 80, no 10, p. 1525.
- DINDYAL, S, et al. The economic benefit of photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2008, vol. 5, no 2, p. 153-158.

DOKKA, S, et al. Dermal delivery of topically applied oligonucleotides via follicular transport in mouse skin. *Journal of investigative dermatology*, 2005, vol. 124, no 5, p. 971-975.

ERLANDSSON, R, et al. The gene from the short arm of chromosome 3, at D3F15S2, frequently deleted in renal cell carcinoma, encodes acylpeptide hydrolase. *Oncogene*, 1991, vol. 6, no 7, p. 1293-1295.

FUJINO, T, et al. Presence of oxidized protein hydrolase in human cell lines, rat tissues, and human/rat plasma. *The Journal of Biochemistry*, 2000, vol. 127, no 2, p. 307-313.

GIUNTINI, F, et al. Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolism. *Journal of medicinal chemistry*, 2009, vol. 52, no 13, p. 4026-4037.

GUYON, L, et al. Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2012, vol. 9, no 1, p. 16-31.

JUZENAS, P; JUZENIENE, A. Reduction of cutaneous photosensitivity by application of ointment containing ferrous or cobaltous ions concomitant with the use of topical protoporphyrin IX precursors. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2010, vol. 7, no 3, p. 152-157.

KENNEDY, J, et al. New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1992, vol. 14, no 4, p. 275-292.

KENNEDY, J, et al. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 1996, vol. 14, no 5, p. 289-304.

KOBAYASHI, K; SMITH, J. Acyl-peptide hydrolase from rat liver. Characterization of enzyme reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, vol. 262, no 24, p. 11435-11445.

LANDES, R, et al. A study of concentration changes of Protoporphyrin IX and Coproporphyrin III in mixed samples mimicking conditions inside cancer cells for Photodynamic Therapy. *PloS one*, 2018, vol. 13, no 8, p. e0202349.

MALLIA, RJ, et al. In vivo temporal evolution of ALA-induced normalized fluorescence at different anatomical locations of oral cavity: application to improve cancer diagnostic contrast and potential. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2010, vol. 7, no 3, p. 162-175.

MAURIZ, JL, et al. Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours. *Curr Drug Targets*, 2010, vol. 11, no 11, p. 1439-1457.

MOAN, J, et al. On the pharmacokinetics of topically applied 5-aminolevulinic acid and two of its esters. *International journal of cancer*, 2001, vol. 92, no 1, p. 139-143.

MUCHA, A, et al. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie*, 2010, vol. 92, no 11, p. 1509-1529.

NOKES, B, et al. Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *Journal of surgical research*, 2013, vol. 181, no 2, p. 262-271.

PALMIERI, G, et al. Acylpeptide hydrolase inhibition as targeted strategy to induce proteasomal down-regulation. *PloS one*, 2011, vol. 6, no 10, p. e25888.

PATRICE, T, et al. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *Photodynamic Therapy*. 2003. p. 81-104.

- PECH, O, et al. Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia. *Gastrointestinal endoscopy*, 2005, vol. 62, no 1, p. 24-30.
- PENG, Q. Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B Biol*, 1996, vol. 34, p. 95-96.
- PEROTTI, C, et al. ALA and ALA hexyl ester induction of porphyrins after their systemic administration to tumour bearing mice. *British journal of cancer*, 2002, vol. 87, no 7, p. 790.
- RODRIGUEZ, L, et al. Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2007, vol. 6, no 12, p. 1306-1310.
- RODRIGUEZ-VICIANA, P., et al. Cancer targets in the Ras pathway. En *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2005. p. 461-467.
- ROGERS, L., et al. An efficient synthesis of 5-aminolaevulinic acid (ALA)-containing peptides for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, no 29, p. 6951-6958.
- ROUGIER, A; LOTTE, C. Correlations between horny layer concentration and percutaneous absorption. *Pharmacology and skin: 1. Skin Pharmacokinetics*, 1986.
- SCHOENBERGER, O, et al. N-acetylalanine aminopeptidase activity in normal and tumour cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1986, vol. 24, no 6, p. 375-378.
- SINGH, P. Percutaneous penetration as a method of delivery to skin and underlying tissues. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 1999, vol. 97, p. 597-613.
- STUMMER, W, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology*, 2006, vol. 7, no 5, p. 392-401.
- YAMIN, R, et al. Acyl peptide hydrolase, a serine proteinase isolated from conditioned medium of neuroblastoma cells, degrades the amyloid- β peptide. *Journal of neurochemistry*, 2007, vol. 100, no 2, p. 458-467.

CAPÍTULO 4

Estudio de dos nuevos dendrímeros de ALA

Uno de los enfoques para la mejora en la ALA-TFD es la posibilidad de incluir moléculas de ALA dentro de estructuras macromoleculares que sirvan de vehículo para su transporte.

Los dendrímeros son nanotransportadores muy atractivos por su gran carga útil por molécula, y por presentar una estructura definida y controlable. El estudio de los dendrímeros conjugados de ALA con 3 ó 18 residuos de ALA, ha demostrado la capacidad de sintetizar excelentes niveles de porfirinas intracelulares, utilizando concentraciones menores en comparación a dosis equimolares de ALA libre (Battah et al., 2001, 2006; Di Venosa et al., 2006; Casas et al., 2009). Sin embargo, el dendrímero con 18 residuos de ALA resultó tóxico a concentraciones más elevadas (Casas et al., 2009).

Continuando esta línea de trabajo, se testearon dos nuevos dendrímeros de ALA con menor tamaño y carga útil, en este caso con 6 y 9 residuos respectivamente (Figura 4.1).

Con estas configuraciones se espera mejorar los niveles de síntesis de porfirinas, así como también la penetración del ALA dentro del tumor y disminuir su toxicidad a concentraciones elevadas. Otro enfoque interesante es el aprovechamiento de estas moléculas para su uso en fotoangioplastia, debido a que por su gran tamaño molecular pueden ser captados por macrófagos del sistema retículoendotelial presentes en la placa ateromatosa.

Como modelo biológico se utilizó para el primer enfoque, la línea tumoral LM3 de adenocarcinoma mamario murino, tanto para los ensayos *in vitro* como los *in vivo*, debido a los buenos niveles de porfirinas alcanzados por estas células a partir de ALA y por su facilidad de empleo en modelos *in vivo* de ratones BALB/c sin necesidad de utilizar ratones nude.

En tanto que para el segundo enfoque, se utilizaron la línea HMEC-1 y la línea RAW 264.7 en representación del componente endotelial y macrofágico de la placa ateromatosa respectivamente.

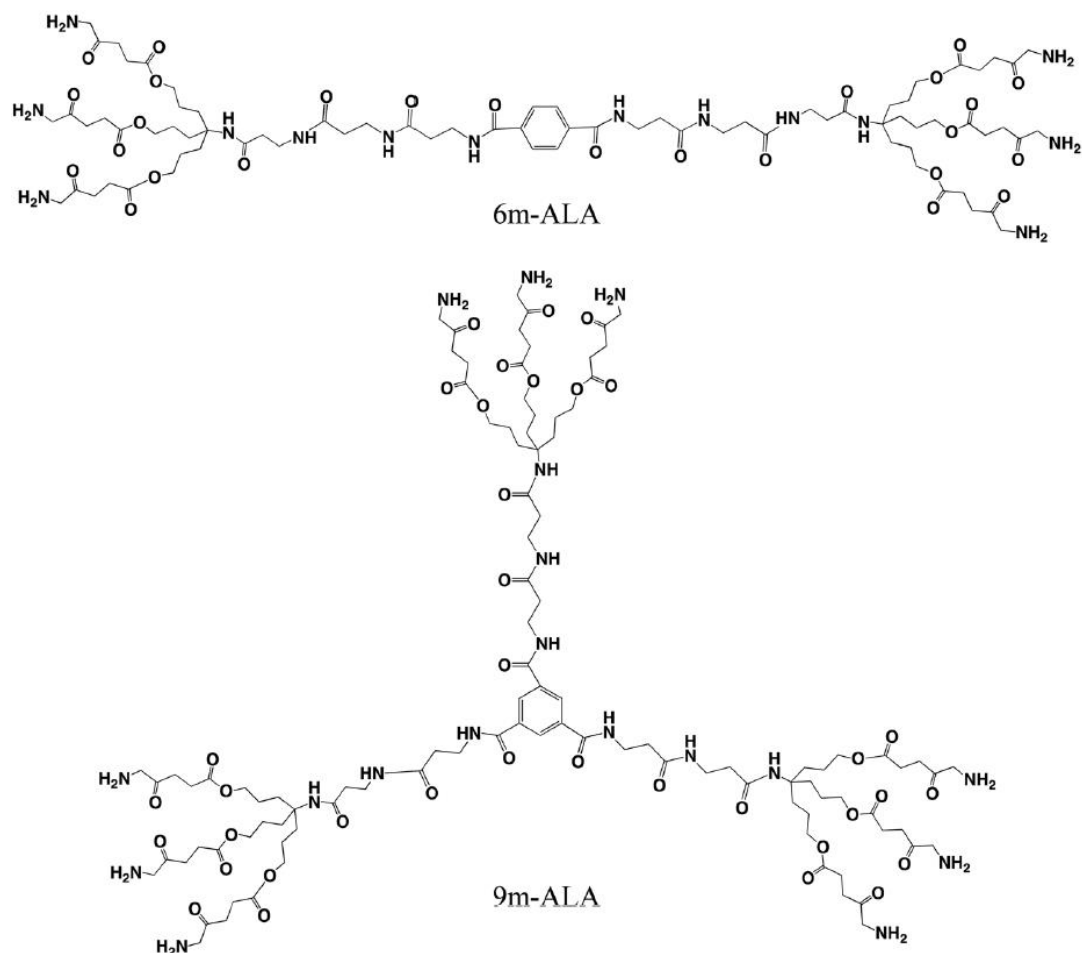


Figura 4.1. Estructura química de los dendrímeros de ALA denominados 6m-ALA (PM: 1502) y 9m-ALA (PM: 2215). ALA (PM: 168)

4.1 Síntesis de porfirinas en cultivos *in vitro* en células LM3

Se evaluó la síntesis de porfirinas a partir de ALA y de los dendrímeros de ALA en cultivos *in vitro* de la línea LM3 en función de la concentración de ALA o dendrímero (Mat. y Mét. Secciones 6 y 7) (Figura 4.2).

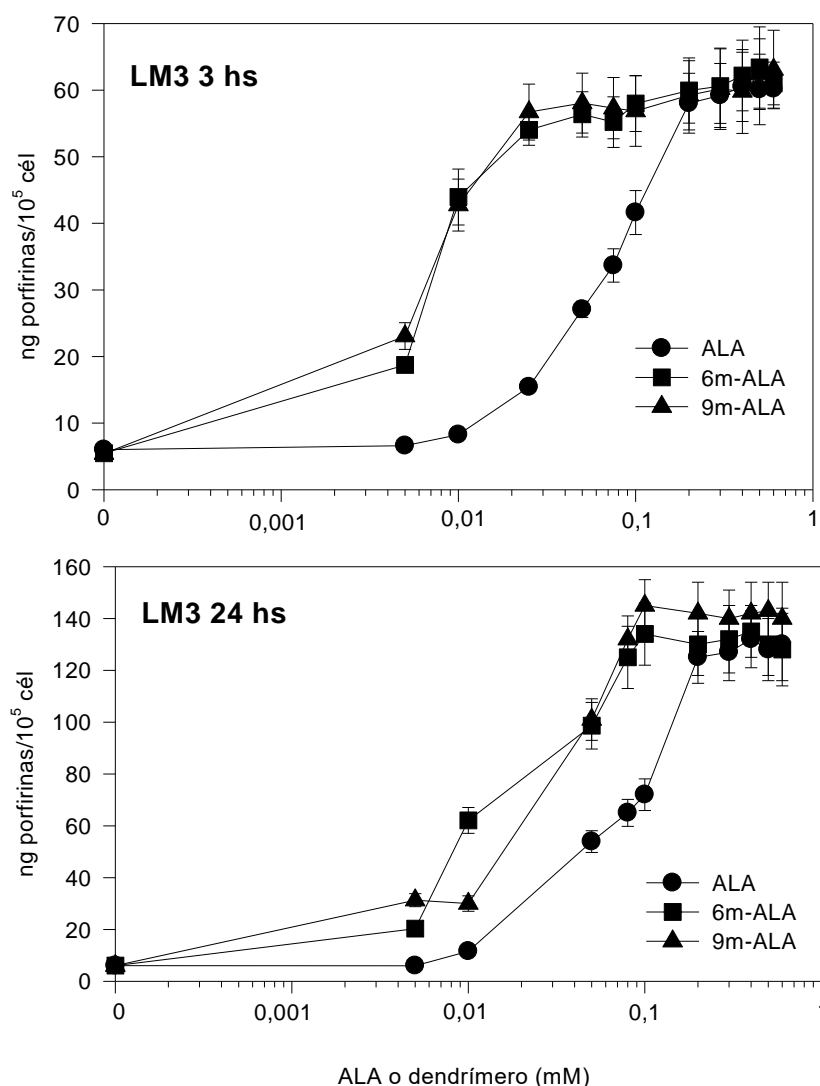


Figura 4.2. Síntesis de porfirinas a partir de ALA o de los dendrímeros de ALA en células LM3. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ALA o de los dendrímeros, durante 3 h (A) o 24 h (B). Los niveles intracelulares de porfirinas fueron determinados mediante fluorimetría, y normalizados a partir del número de células presentes al finalizar el experimento.

Se observa que luego de un período de incubación de 3 h empleando bajas concentraciones, ambos dendrímeros indujeron una cantidad de porfirinas más altas en comparación con el ALA ($54,02 \pm 2,3$ y $56,7 \pm 4,2$ ng porfirinas/ 10^5 células para 6m-ALA y 9m-ALA respectivamente y $15,4 \pm 0,8$ ng porfirinas/ 10^5 células para ALA) empleando una concentración de 0,025 mM. Se obtuvieron valores plateau con ALA a partir de una concentración de 0,3 mM, mientras que para los dendrímeros se necesitaron concentraciones más de 10 veces menores. La gran carga de ALA de los dendrímeros se correlaciona con una alta de síntesis de

porfirinas, si bien los valores máximos o plateau obtenidos son similares para ALA y sus dendrímeros (alrededor de 60 ng de porfirinas/ 10^5 células).

Empleando períodos de incubación mayores (24 h), se obtuvieron perfiles de porfirinas similares a los de 3 horas. Empleando bajas concentraciones, la cantidad de tetrapirroles generados a partir de los dendrímeros resultó significativamente más alta que la alcanzada con ALA. Sin embargo las diferencias entre las porfirinas inducidas por los dendrímeros y por ALA son menos marcadas ($53,9 \pm 4,2$ para ALA; $98,6 \pm 9,0$ y $101,0 \pm 8,2$ ng porfirinas/ 10^5 células a partir de 6m-ALA y 9m-ALA respectivamente) con concentraciones de 0,05 mM.

Los valores plateau se obtuvieron a mayores concentraciones en comparación con el perfil obtenido a las 3 horas; la síntesis máxima de PpIX fue de alrededor de 140 ng de porfirinas/ 10^5 células para los tres compuestos testeados.

4.2. Terapia Fotodinámica *in vitro*

En correlación con los perfiles de síntesis de porfirinas, la Figura 4.3 muestra que, cuanto más elevada es la cantidad de porfirinas más alto es también el fotodaño ocasionado a una dada dosis lumínica, comparando ALA con sus dendrímeros. La TFD (Mat. y Mét., sección 9) fue aplicada luego de 3 h de incubación con ALA o dendrímeros a una concentración de 0,025 mM, la cual garantiza el plateau de concentración para los dendrímeros pero no así para el ALA. Bajo estas condiciones, el ALA genera una disminución del 50% en la sobrevida del cultivo celular, mientras que empleando los dendrímeros el fotodaño alcanzado es del 85-90%.

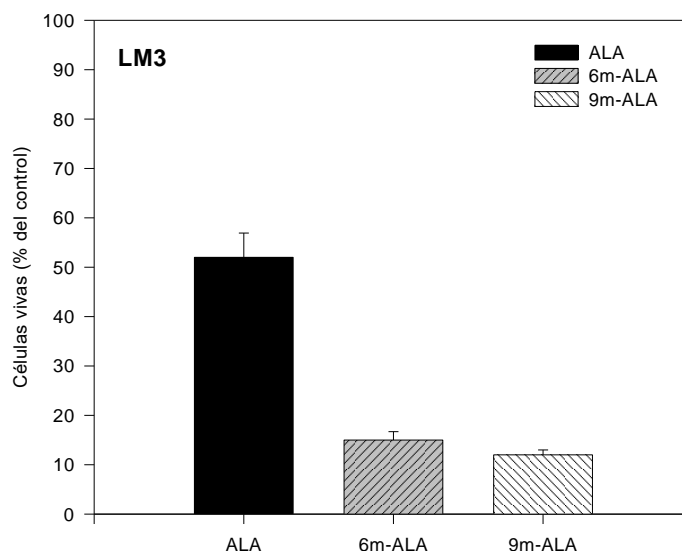


Figura 4. 3. Sobrevida celular luego de la TFD. Las células LM3 fueron incubadas con una concentración de 0,025 mM de ALA o de los dendrímeros durante 3 horas. Luego de lo cual se realizó la TFD (150 mJ/cm^2), la viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de MTT, y representada como porcentaje del control no irradiado.

4.3. Ensayo *in vivo* tópico: síntesis de porfirinas

Empleando la tecnología de detección de fluorescencia por fibra óptica acoplada a un detector de fluorescencia (Mat. y Mét., sección 14, 15 y 16), se analizó la formación de porfirinas en función del tiempo, luego de la aplicación tópica de ALA y dendrímeros sobre la piel adyacente al tumor (PAT) de un ratón implantado subcutáneamente con células de la línea LM3 (Figura 4.4A). Para comparar la producción de porfirinas generadas por los dendrímeros en relación al ALA, se utilizaron 5 mg de ALA, 7,45 mg de 6m-ALA y 7,32 mg de 9m-ALA. Estas dosis de dendrímeros fueron usadas de manera de administrar una cantidad de droga equimolar a la dosis de ALA, puesto que cada dendrímero posee 6 ó 9 residuos de ALA respectivamente.

El ALA induce perfiles de producción de porfirinas similares en la PAT en comparación con la piel distante. Esto se puede deber a una rápida difusión de la molécula a otros sitios. Por otro lado, los dendrímeros inducen bajas cantidades de porfirinas en la piel distante y altas en la PAT en relación a lo producido con ALA. Mientras que en PAT los niveles de porfirinas llegan a un máximo a las 3 h de aplicación, los dendrímeros lo hacen a las 4 h.

La Figura 4.4B representa la cantidad de porfirinas sintetizadas a las 3 y 4 horas luego de la aplicación tópica de ALA y dendrímeros respectivamente por el tumor, PAT y piel distante, cuantificados luego de su extracción química (Mat. y Mét., sección 17), a los tiempos de síntesis máxima calculados a partir de la Figura 4.4A. Mientras que tanto para el tumor como la piel distante los niveles de porfirinas sintetizadas por los dendrímeros es mucho menor que con ALA, en la PAT los valores son significativamente más altos a partir de los dendrímeros, lo cual significa que las porfirinas sintetizadas a partir de los estos están siendo selectivamente sintetizadas y retenidas en el sitio de aplicación, sin difusión hacia el área tumoral.

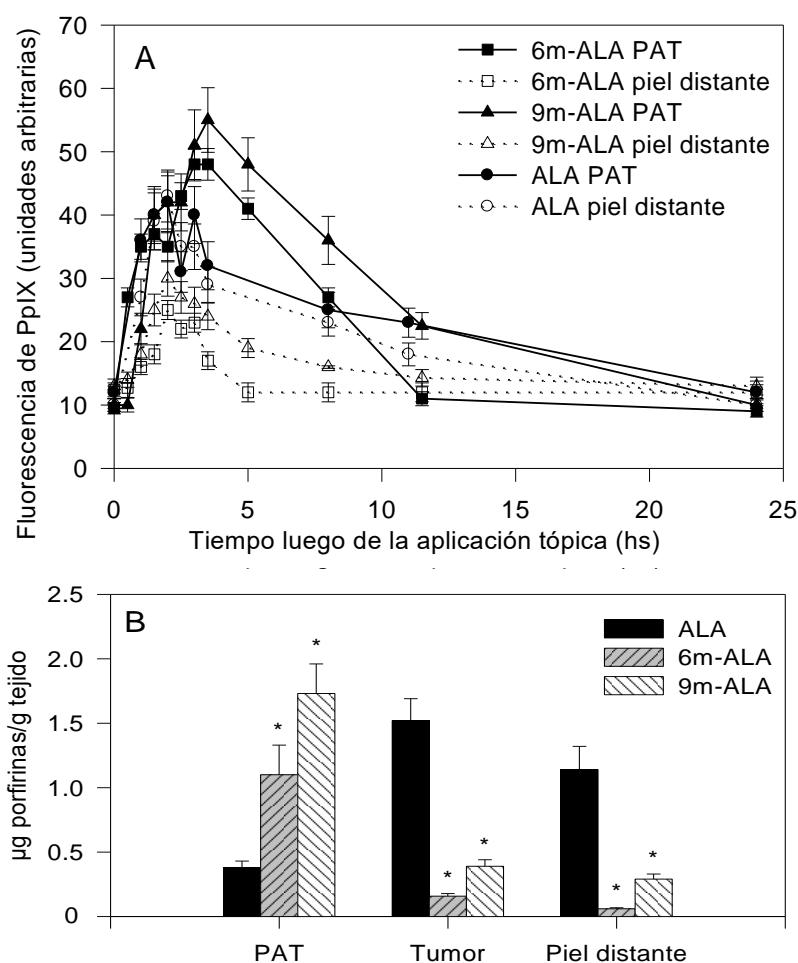


Figura 4.4. Síntesis de porfirinas sobre PAT y piel distante luego de la aplicación de ALA o de sus dendrímeros sobre un tumor LM3 de implantación subcutánea. Tanto ALA como sus derivados fueron aplicados tópicamente a concentraciones equimolares a 5 mg de ALA en la PAT. Se monitoreó la fluorescencia de las porfirinas a diferentes tiempos luego de la aplicación, mediante el uso de una fibra óptica acoplada a un fluorómetro. La determinación se realizó sobre la PAT y la piel distante, se muestra el promedio de tres ratones por tratamiento (A). La acumulación de porfirinas se determinó por extracción química en el tumor, la PAT y piel distante, de 3 ratones sacrificados a los tiempos máximos de síntesis en (B). *, $p < 0,05$ en comparación con ALA.

4.4. Síntesis de porfirinas *in vitro* en componentes celulares de la placa ateromatosa

Para el estudio de los dos nuevos dendrímeros 6m-ALA y 9m-ALA como potenciales FS en placa ateromatosa, se emplearon como modelo biológico las células RAW 264.7 y HMEC-1, como células representativas de los componentes celulares macrofágico y endotelial respectivamente.

De igual manera que en la línea tumoral, en primer lugar se evaluó la síntesis de porfirinas (Mat. y Mét., secciones 6 y 7) a partir de ALA y sus dendrímeros en ambas líneas celulares (Figuras 4.5 y 4.6).

Luego de la incubación por un período de 3 horas y empleando bajas concentraciones (0,025 mM), ambos dendrímeros indujeron en los macrófagos RAW 264.7 una alta síntesis de porfirinas en comparación con el ALA (32 ± 3 para ALA; 145 ± 12 y 147 ± 10 ng porfirinas/ 10^5 células para 6m-ALA y 9m-ALA respectivamente). Valores plateau (alrededor de 160 ng porfirinas/ 10^5 células) se obtuvieron a partir de 0,2 mM de ALA, mientras que con los dendrímeros se obtuvieron las mismas concentraciones de porfirinas empleando 0,025 mM, lo que representa una concentración aproximadamente unas 10 veces menor cantidad del compuesto (Figura 4.5). Luego de 24 horas de incubación, los valores de porfirinas sintetizadas se incrementaron significativamente. Utilizando concentraciones de 0,05 mM, el ALA indujo 68 ± 6 ng porfirinas/ 10^5 células, mientras que para los dendrímeros la cantidad de porfirinas fue de 146 ± 12 y 280 ± 25 para 9m-ALA y 6m-ALA respectivamente a la misma concentración.

De manera similar, las porfirinas inducidas en células HMEC-1 a partir de bajas concentraciones de dendrímeros (0,025 mM) a las 3 h de incubación fue mayor (Figura 4.6) comparado con los niveles obtenidos con ALA. Los valores de porfirinas sintetizadas fueron de 20 ± 2 para ALA; y de 24 ± 2 y 32 ± 2 ng/ 10^5 células para 6m-ALA y 9m-ALA respectivamente.

Empleando períodos largos de incubación (24 horas), las diferencias entre las porfirinas obtenidas con ALA en relación a las obtenidas con los dendrímeros se vuelven más acentuadas a bajas concentraciones. Valores de porfirinas de 68 ± 5 para ALA; 129 ± 12 para 6m-ALA y 132 ± 13 ng porfirinas/ 10^5 células para 9m-ALA, se obtuvieron empleando una concentración de 0,05 mM, siendo los valores plateau obtenidos 3 veces más altos que los sintetizados en incubaciones de 3 hora.

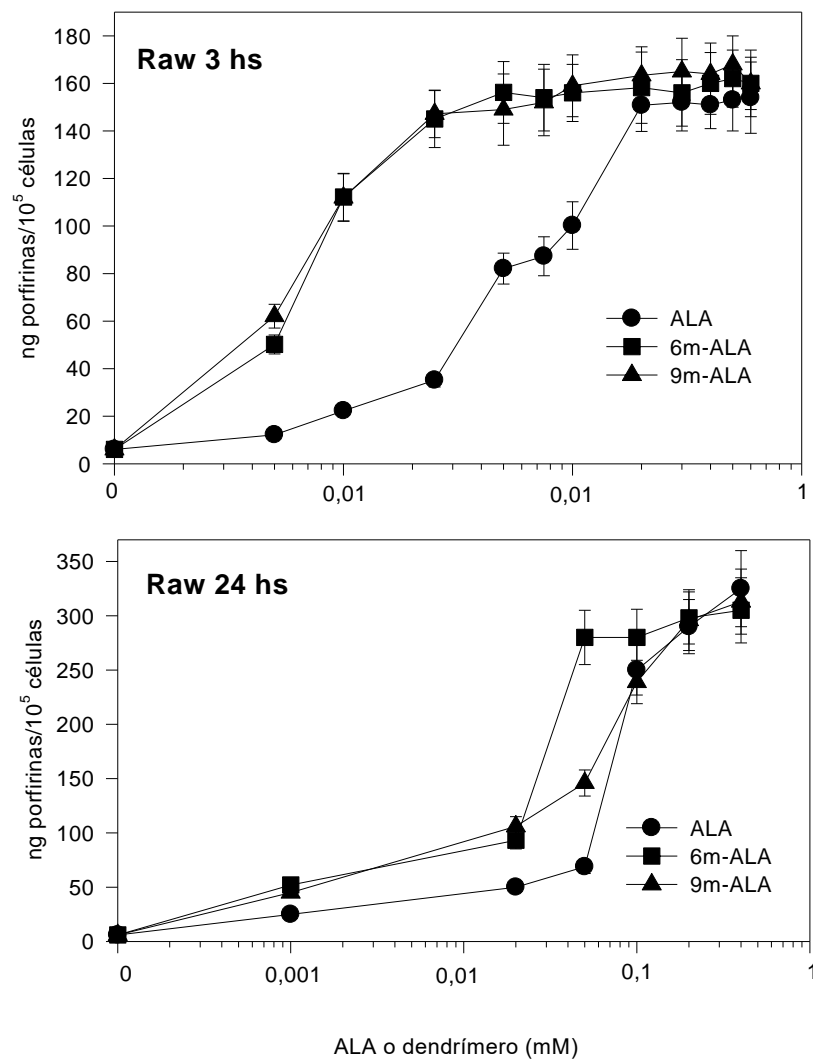


Figura 4.5. Síntesis de porfirinas a partir de ALA o de sus dendrímeros en células RAW 264.7. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ALA o dendrímeros durante 3 horas (A) o 24 horas (B). Los niveles de porfirinas intracelulares fueron determinados fluorométricamente y normalizadas a partir del número de células presentes al final del experimento.

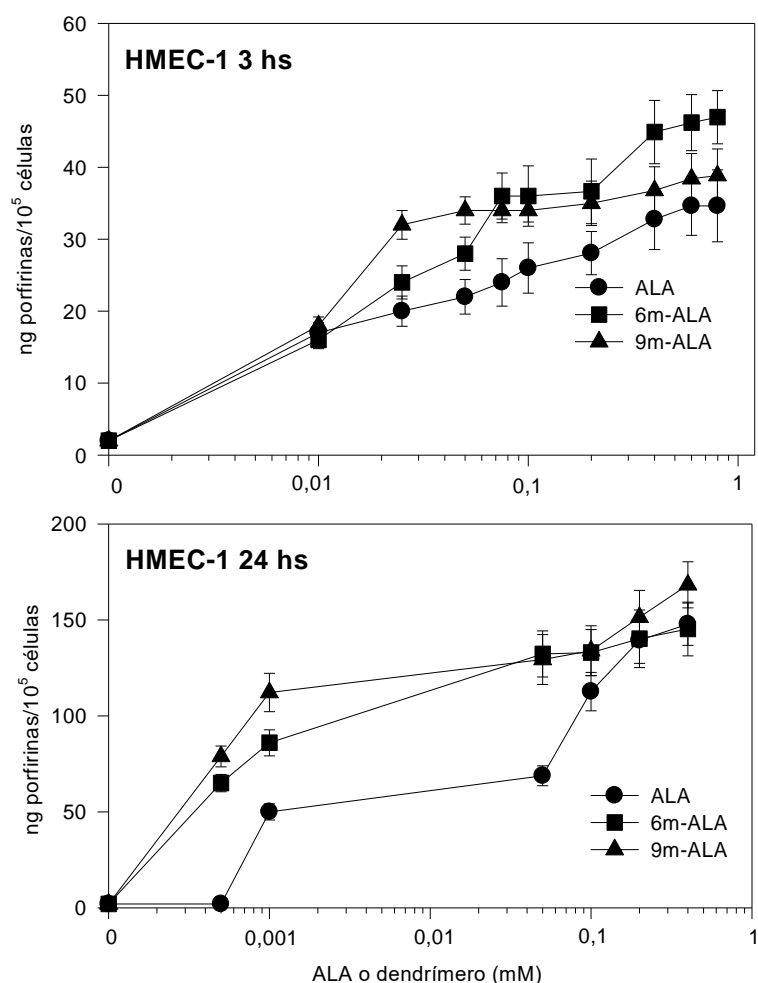


Figura 4.6. Síntesis de porfirinas a partir de ALA o de sus dendrímeros en células HMEC-1. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de ALA o dendrímeros durante 3 horas (A) o 24 horas (B). Los niveles de porfirinas intracelulares fueron determinados fluorométricamente y normalizadas a partir del número de células presentes al final del experimento.

Para corroborar la selectividad de los dendrímeros por las células macrofágicas, se calculó la relación entre los niveles de porfirinas sintetizadas por los macrófagos y por las células endoteliales a una dada concentración (Tabla 4.1). Dicha relación para 3 h de incubación con ALA es de 1,7; 6 para 6m-ALA y 4,6 9m-ALA, mostrando así que los dendrímeros de ALA poseen una mayor selectividad que ALA libre por los macrófagos. Por otra parte, empleando tiempos largos de incubación (24 h) dicha relación cae a 2,1 y 1,1 respectivamente, mientras que con ALA es de 1.

Tabla 4.1. Relación entre la síntesis de porfirinas entre macrófagos y células endoteliales expuestas a ALA o dendrímeros.

	ALA	6m-ALA	9m-ALA
Macrófagos / células endoteliales a 3 h (0,025 mM)	1,7	6,0	4,6
Macrófagos / células endoteliales a 24 h (0,05 mM)	1,0	2,1	1,1

La relación de síntesis de porfirinas fue calculada en base a los valores obtenidos con concentraciones 0,025 y 0,05 mM a 3 y 24 h de incubación respectivamente, tomadas de las Figuras 4.5 y 4.6.

4.5. Terapia fotodinámica en los componentes celulares de la placa ateromatosa

Empleando incubaciones de 3 h en presencia de 0,025 mM de ALA o dendrímeros, la TFD (Mat. y Mét., sección 9) induce condiciones leves de muerte celular para HMEC-1, mientras que para los macrófagos RAW 264.7 tratados con dendrímeros de ALA se alcanzó una muerte total, mientras que para ALA no hubo muerte por fotodaño en ninguno de los 2 tipos celulares (Figura 4.7).

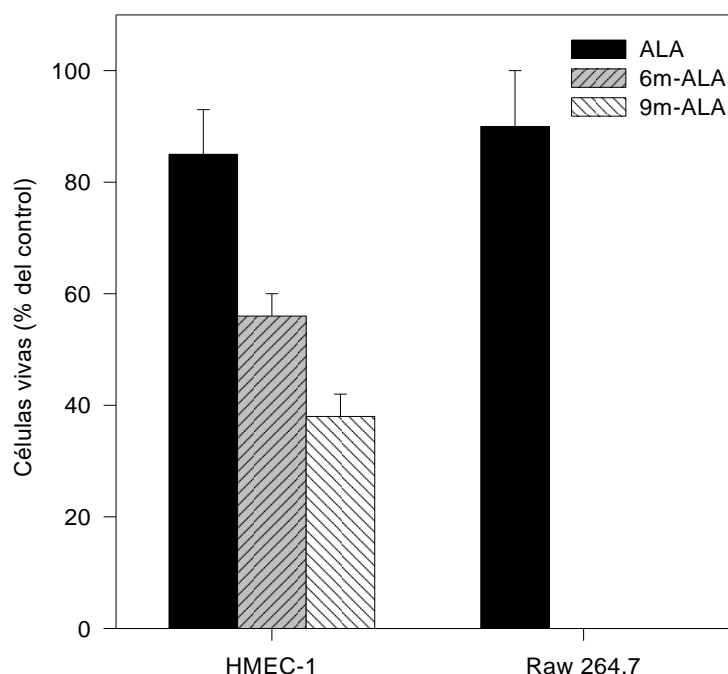


Figura 4.7. Sobrevida celular de HMEC-1 y RAW 264.7 luego de la TFD. Las células fueron incubadas con una concentración de 0,025 mM de ALA o de dendrímeros durante 3 horas, luego de lo cual, se realizó la TFD (600 mJ/cm²), y se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, expresado como un porcentaje del control de células no irradiadas.

4.6. Comparación de síntesis de porfirinas en células RAW 264.7 y HMEC-1 expuestas a concentraciones equimolares de ALA y dendrímeros

Debido a que los dendrímeros transportan 6 ó 9 moléculas de ALA respectivamente, se calculó la cantidad de ALA liberada por los dendrímeros expresada en equivalentes molares de ALA, y se compararon los valores de síntesis de porfirinas tomados de las Figuras 4.2, 4.5, y 4.6 (Tabla 4.2). Se observó que de las tres líneas empleadas, la que mayor síntesis de porfirinas induce es la RAW 264.7. Por otra parte, a bajas concentraciones, entre 0,045 y 0,06 mM, el dendrímero 6m-ALA es el que mayores niveles de síntesis genera tanto en la línea LM3 como en RAW 264.7, siendo sensiblemente superior al ALA y al 9m-ALA. Es de destacar que la línea HMEC-1 es la que menos síntesis de porfirinas produce para todos los compuestos evaluados, siendo ésta muy similar para los tres compuestos ensayados.

Tabla 2. Síntesis de porfirinas (expresadas como ng porfirinas/10⁵ células) en las células LM3, HMEC-1 y Raw 264.7 producida en 3 horas, en relación a los equivalentes de molares de ALA de cada dendrímero.

	Concentración (mM)	Equivalentes molares de ALA (mM)	Porfirinas LM3	Porfirinas Raw 264.7	Porfirinas HMEC-1
ALA	0,005	0,005	6,66	12,2	2
	0,01	0,01	8,2	22,3	17
	0,05	0,05	27,1	82,1	22,3
	0,1	0,1	41,6	100	26,1
	0,5	0,5	60,1	153	32,7
6m-ALA	0,005	0,03	18,7	50,2	5,3
	0,01	0,06	43,9	112	16,2
	0,05	0,3	56,3	156	28,5
	0,1	0,6	58	156	36,2
	0,5	3	63,4	162	44,9
9m-ALA	0,005	0,045	23,1	62,1	6,7
	0,01	0,09	42,5	112	18,4
	0,05	0,45	58,1	149	34,2
	0,1	0,9	56,8	159	34,3
	0,5	4,5	62,4	168	36,8

4.7. Ensayo de captación celular e inhibición de la endocitosis

Los macrófagos son células diferenciadas para incorporar material extracelular, sumado a ello, los dendrímeros son estructuras grandes, de escala macromolecular, y pueden ser candidatas especiales a ser endocitadas por estas células.

Para comprender mejor los mecanismos de endocitosis, las células RAW 264.7 fueron pre-tratadas con drogas (Mat. y Mét., sección 12.2.2) que inhiben selectivamente la endocitosis dependiente de clatrina (clorpromazina), la endocitosis dependiente de caveolas (nistatina y NEM), y macropinocitosis (amilorida) antes de ser expuestas a los dendrímeros (Tabla 4.3). Los posibles efectos citotóxicos de las drogas se testaron mediante el ensayo del MTT, de manera de ajustar las concentraciones que inducen una mínima citotoxicidad.

Empleando inhibidores de la endocitosis mediada por caveolas, la síntesis de porfirinas a partir de ambos dendrímeros se vio disminuida entre un 35-45%, demostrando que este proceso está involucrado en la incorporación de los mismos. Por otro lado, ni la macropinocitosis, ni la endocitosis mediada por clatrininas se encontró involucrada en el proceso.

Debido a que se conoce que el transporte entre endosomas y lisosomas se encuentra bloqueado a 18°C (van Deurs et al., 1987; Dunn et al., 1980), se evaluó si dicha temperatura puede bloquear el transporte de dendrímeros de los endosomas hacia los lisosomas en macrófagos RAW 264.7 (Mat. y Mét., sección 12.2.1). A esta temperatura, se observó una inhibición de la síntesis de porfirinas de un 48% y 38% para 6m-ALA y 9m-LA respectivamente, debido al bloqueo de este proceso de transporte.

Tabla 4.3. Porcentaje de inhibición de la endocitosis. Las células RAW 264.7 fueron preincubadas con los inhibidores de la endocitosis y subsecuentemente incubadas con 0,3 mM de ALA o de los dendrímeros. Luego de 3 horas de incubación se evaluó la síntesis de porfirinas. Alternativamente, los macrófagos se incubaron por 3 horas a 18°C en presencia de ALA o de los dendrímeros, evaluando luego la síntesis de porfirinas. El porcentaje de inhibición de la endocitosis fue inferida a partir de la disminución de la síntesis de porfirinas respecto al control sin inhibidor o a al tratamiento a 37°C. Los resultados se expresan en porcentaje de disminución.

	ALA	6m-ALA	9m-ALA
N-etilmaleimida (NEM)	10 ± 1,1	46 ± 6,2	43,7 ± 5,3
Nistatina	8,7 ± 0,9	40 ± 3,8	35,9 ± 3,4
Amilorida	7,1 ± 0,5	7,9 ± 0,9	3,9 ± 5,1
Clorpromazina	2,9 ± 0,4	12,7 ± 1,1	11,7 ± 1,8
18°C	8,3 ± 0,7	48,3 ± 5,3	38,3 ± 4,2

4.8. Discusión

La conjugación de drogas anti-tumorales con macromoléculas tales como los dendrímeros es una herramienta de uso actual para mejorar la acción de las drogas sobre los blancos tumorales (Gunther et. al., 2005). En el presente trabajo se ha encontrado que los dendrímeros de ALA son moléculas prometedoras en el tratamiento del cáncer superficial, puesto que inducen altas cantidades de porfirinas en el área de aplicación con mínima difusión a los tejidos distantes. La relación entre las porfirinas acumuladas en la PAT y la piel distante fueron de 0,4 para el ALA; 9,2 para el 6m-ALA y de 4,7 para el 9m-ALA luego de su aplicación tópica, demostrando la mayor retención en el sitio de aplicación de los nuevos dendrímeros. Por otro lado, al relacionar la síntesis obtenida en el tumor y el tejido normal o piel distante se observa que la relación es de 1,25 para ALA; 2,1 para 6m-ALA y 1,3 para el 9m-ALA, lo que describe una mayor selectividad por el tumor y a la vez, una menor difusión del dendrímero con 6 residuos de ALA.

El dendrímero 6m-ALA, había sido previamente administrado en tumores de vejiga de rata (François et. al., 2012), y en dicho trabajo se encontraron relaciones de fluorescencia entre el tumor y el urotelio normal de alrededor de 1,2, y entre el tumor y el músculo de 2; relaciones muy similares a las obtenidas empleando éster hexílico de ALA (He-ALA). A su vez en el mencionado trabajo, 6m-ALA demostró una mayor penetración y ausencia de reabsorción sistémica.

En el presente trabajo, luego de la administración tópica de los dendrímeros, el tiempo de máxima formación de porfirinas muestra estar retrasado 1 hora respecto a la aplicación de ALA. Un comportamiento similar había sido reportado por nuestro laboratorio para el dendrón 3m-ALA (con 3 residuos de ALA, Di Venosa et. al., 2006), y se sospecha que esta demora en la cinética de producción de porfirinas se debe a la retención del dendrón, más lipofílico, dentro del estrato córneo de la piel en el sitio de aplicación.

La capacidad de retención por el estrato córneo parece ser crucial en el uso de ésteres y dendrímeros de ALA. Para el 6m-ALA y el 9m-ALA se encontró que la piel distante al sitio de aplicación tópica, exhibe niveles de porfirinas significativamente menores que el ALA. Previamente, se había encontrado este mismo patrón para el dendrón 3m-ALA (Di Venosa et al., 2006), así como también para el derivado He-ALA (Perotti et al., 2004). La liberación lenta del ALA a partir de los dendrímeros ha sido previamente reportada *in vivo* para 6m-ALA en células tumorales. Por el contrario, no se observó liberación gradual de ALA a partir del dendrímero luego de su aplicación tópica (Di Venosa et al., 2006).

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que los niveles de porfirinas generados a partir de los dendrímeros que contenían 18 residuos de ALA (18m-ALA), resultaron significativamente menores luego de un pre-tratamiento con el inhibidor de macropinocitosis 5- (N-etil-N-isopropil) amilorida, mientras que N-etilmaleimida no indujo ningún efecto sobre la síntesis de porfirinas (Battah et al., 2007). Sin embargo, la entrada y el transporte de las nanopartículas pueden depender del tipo celular, de la carga, y del tamaño de las partículas (Sahay et al., 2010). En el presente trabajo se encontró que la endocitosis mediada por caveolas está implicada en la incorporación intracelular de 6mALA y 9m-ALA. Sin embargo, ni la macropinocitosis ni la endocitosis mediada por clatrina se encuentran involucradas en la entrada del dendrímero de ALA a los macrófagos. Este comportamiento era esperable, ya que se ha reportado previamente para los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) que el mecanismo de entrada dependería del tamaño de los dendrímeros, siendo los dendrímeros más pequeños absorbidos por la endocitosis dependiente de clatrina y los más grandes por mecanismos múltiples (Kitchens et al., 2007; Seib et al., 2007).

Existen varios tipos diferentes de endocitosis, todas ellas basadas en la formación de vesículas intracelulares después de la invaginación de la membrana plasmática, o bien dando lugar a vesículas más grandes. Estas vías endocíticas se distinguen por sus reguladores moleculares específicos (Iversen et al., 2011). Se han

identificado dos vías principales para la endocitosis mediada por receptores: las vías endocíticas dependientes de clatrina y de caveolas. La endocitosis clatrina-dependiente es el mecanismo mejor caracterizado de internalización de los receptores de membrana en las células. También es importante para el tráfico intracelular en la red trans-Golgi y los endosomas. La endocitosis dependiente de caveolas está implicada en múltiples procesos biológicos, incluyendo la entrada de virus en las células huésped, la internalización de las proteínas ancladas en glicofosfatidil-inositol y la regulación de ciertas cascadas de señalización (Zhu et al., 2011). La macropinocitosis es un caso especial de endocitosis independiente de clatrina y caveolas, que se inicia por la activación transitoria de receptores tirosina quinasa por factores de crecimiento. La activación del receptor media una cascada de señalización que conduce a cambios en el citoesqueleto de actina y desencadena la formación de proyecciones de membrana. Estas membranas proyectadas sobresalen para incorporar el fluido y los nutrientes circundantes en el medio extracelular (Mercer y Helenius, 2009). Se ha demostrado que todas estas vías endocíticas están implicadas en la captación de nanopartículas (Iversen et al., 2011).

Las diferencias específicas de las células también juegan un papel en la captación de macromoléculas: diferentes tipos de dendrímeros han sido incorporados por endocitosis mediada por clatrina en células Caco-235 y por macropinocitosis en células A549 (Perumal et al., 2008; Fröhlich, 2012). También se ha visto que para el transporte de genes a partir de dendrímeros se utilizan distintas vías de internalización en distintas células, pero que la vía mediada por caveolas constituye una ruta preferencial (Manunta et al., 2004, 2006).

Además, se ha demostrado que la endocitosis mediada por clatrina, caveolas y los procesos de macropinocitosis se encuentran activos en los macrófagos RAW 264.7 y están implicados en la captación de nanopartículas micelares independientemente de la carga de las moléculas (Xiao et al., 2011). De manera similar, existen varias vías endocíticas principales en las células endoteliales, incluyendo la endocitosis mediada por clatrininas y caveolas, fagocitosis y macropinocitosis. Estos últimos pueden ser de interés para la administración intracelular de fármacos a células endoteliales implicadas en la inflamación (Muro et al., 2004; Stan, 2006). Sin embargo, los macrófagos incorporan dendrímeros de ALA a velocidades de 4,6 a 6 veces más altas que las células endoteliales HMEC-1, mostrando así que la capacidad endocítica de los macrófagos explica la selectividad de los dendrímeros de ALA por dicho tipo celular.

A pesar de que las caveolas están presentes en muchos tipos celulares, son especialmente abundantes en las células endoteliales. Otra diferencia importante es que la internalización mediada por caveolas no es una ruta de internalización ácida ni digestiva. Además, la evidencia de la expresión de la caveolina en los macrófagos ha sido escasa y contradictoria (Lei y Morrison, 2000), sin embargo el ARNm de la caveolina-1 se detectó en los macrófagos RAW 264.7 (Gargalovic y Dory, 2001). Las caveolas no sufren una caída en el pH y la mayoría de las moléculas internalizadas por este mecanismo pueden ser transportadas directamente al retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi, evitando así la degradación lisosomal normal (Khalil et al., 2006). Esto implica que las esterasas ácidas no estarían siendo involucradas en absoluto en la liberación de residuos de ALA de los dendrímeros.

La capacidad de eliminar selectivamente a los macrófagos tiene aplicaciones en el tratamiento del cáncer y en la detección y terapia de los ateromas, y posiblemente en enfermedades autoinmunes y algunas infecciones (Demidova y Hamblin 2004). La eficacia de la TFD vascular se basa en la acumulación selectiva del FS en la placa ateromatosa. La cinética diferencial de la formación de porfirinas en los diferentes tipos celulares de una placa fue demostrada por Jenkins y colaboradores (1998). Luego de la administración de ALA en cerdos sanos, la fluorescencia de las porfirinas alcanzó su punto máximo en las capas adventicia, la íntima y las capas medias a 1,5; 4 y 6 h, respectivamente. A las 6 h después de la administración de ALA, la relación de media (células musculares): íntima (endotelio) de porfirinas acumulada era de aproximadamente 2.

En el presente trabajo, los estudios *in vitro* empleando macrófagos RAW 264.7 y células endoteliales HMEC-1 sugieren que con el uso de dendrímeros se ha mejorado la relación de porfirinas de macrófagos/células endoteliales que se había obtenido con ALA. Las relaciones obtenidas a 3 h empleando concentraciones de 0,025 mM fueron de 6,0 y 4,6 para 6m-ALA y 9m-ALA respectivamente; sugiriendo que los dendrímeros son mejores herramientas que el ALA para destruir selectivamente la placa ateromatosa mediante el empleo de la TFD vascular.

En el proceso de síntesis de porfirinas a partir de dendrímeros de ALA, están implicados varios pasos: (a) entrada del dendrímero en las células, (b) hidrólisis enzimática y liberación de ALA, (c) la generación endógena de las porfirinas por las enzimas de la ruta biosintética del hemo. En el presente trabajo se calculó la cantidad de ALA suministrada a partir de los dendrímeros expresados en equivalentes molares de ALA, y se encontró que tanto en células tumorales como

en macrófagos los dendrímeros son más eficaces que el ALA a bajas concentraciones. Esto se había encontrado previamente en otras células tumorales para ésteres de ALA y dendrones, (Di Venosa et al, 2006; Perotti et al., 2004) y se cree que este comportamiento está altamente influenciado por la etapa de la entrada de estas moléculas a las células.

A períodos de incubación más largos, las diferencias entre los dendrímeros y el ALA se vuelven menos notorias, y esto puede deberse a un rol más preponderante y limitante de la síntesis de porfirinas más que al mecanismo de entrada de las drogas. En trabajos previos, nuestro grupo ha reportado que a concentraciones elevadas (plateau de síntesis de porfirinas), la regulación en la conversión de ALA a porfirinas es operada por la enzima porfobilinogenasa (Di Venosa et al., 2006).

Por otra parte, para las células HMEC-1, los dendrímeros no aumentan la producción de porfirinas a partir de ALA incluso a bajas concentraciones, y atribuimos esto a su baja capacidad endocítica. Teniendo en cuenta las diferentes cargas de ALA en ambos dendrímeros y la similitud de las curvas de síntesis de porfirinas en función de la concentración de la prodroga para las tres líneas celulares y ambos puntos temporales analizados, concluimos que la hidrólisis a partir de 9m-ALA no es completa y que 6m-ALA es un productor de porfirinas igual o mejor que el dendrímero que contiene 9 moléculas de ALA.

En modelos animales, se demostró que después de la administración de ALA, la intensidad de fluorescencia de las porfirinas en la placa ateromatosa alcanzó el pico 2 h después de la inyección y fue alrededor de 10 a 12 veces mayor que la de los segmentos de vasos normales adyacentes (Demidova y Hamblin 2004; Jenkins et al., 1998). Además, Peng et al. (2011) demostraron que las porfirinas a partir de ALA pueden emplearse para reflejar el contenido de macrófagos en la placa, y que ALA-TFD podría reducir el contenido de macrófagos.

Además de su posible uso para la TFD de cáncer, la fotoinangioplastia mediada por dendrímeros de ALA es una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades obstructivas cardiovasculares. Son necesarios estudios en modelos animales para evaluar adicionalmente la selectividad de las porfirinas a partir de dendrímeros en placas ateromatosas, así como extender nuestros estudios a modelos biológicos de otros componentes celulares de la placa como por ejemplo células de músculo liso vascular.

4.9. Referencias

- BATTAH, S, et al. Enhanced porphyrin accumulation using dendritic derivatives of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy: an in vitro study. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 8, p. 1382-1392.
- BATTAH, S, et al. Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Molecular cancer therapeutics*, 2007, vol. 6, no 3, p. 876-885.
- BATTAH, S, et al. Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate chemistry*, 2001, vol. 12, no 6, p. 980-988.
- CASAS, A, et al. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 2009, vol. 135, no 2, p. 136-143.
- DEMIDOVA, T; HAMBLIN, M. Macrophage-targeted photodynamic therapy. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 2004, vol. 17, no 2, p. 117-126.
- DI VENOSA, G, et al. Investigation of a novel dendritic derivative of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 1, p. 82-91.
- FRANÇOIS, A, et al. Fluorescence diagnosis of bladder cancer: a novel in vivo approach using 5-aminolevulinic acid (ALA) dendrimers. *BJU international*, 2012, vol. 110, no 11c, p. E1155-E1162.
- FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 2012, vol. 7, p. 5577.
- GARGALOVIC, P; DORY, L. Caveolin-1 and Caveolin-2 Expression in Mouse Macrophages High Density Lipoprotein 3-Stimulated Secretion and a Lack of Significant Subcellular Co-Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no 28, p. 26164-26170.
- GUNTHER, M, et al. Specific targets in tumor tissue for the delivery of therapeutic genes. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2005, vol. 5, no 2, p. 157-171.
- IVERSEN, T, et al. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 2011, vol. 6, no 2, p. 176-185.
- JENKINS, M, et al. Intra-arterial photodynamic therapy using 5-ALA in a swine model. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 1998, vol. 16, no 4, p. 284-291.
- KHALIL, I, et al. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews*, 2006, vol. 58, no 1, p. 32-45.
- KITCHENS, K, et al. Endocytosis and interaction of poly (amidoamine) dendrimers with Caco-2 cells. *Pharmaceutical research*, 2007, vol. 24, no 11, p. 2138-2145.
- LEI, M; MORRISON, D. Differential expression of caveolin-1 in lipopolysaccharide-activated murine macrophages. *Infection and immunity*, 2000, vol. 68, no 9, p. 5084-5089.
- MANUNTA, M, et al. Gene delivery by dendrimers operates via a cholesterol dependent pathway. *Nucleic acids research*, 2004, vol. 32, no 9, p. 2730-2739.

MANUNTA, M, et al. Gene delivery by dendrimers operates via different pathways in different cells, but is enhanced by the presence of caveolin. *Journal of immunological methods*, 2006, vol. 314, no 1-2, p. 134-146.

MERCER, J; HELENIUS, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*, 2009, vol. 11, no 5, p. 510.

MURO, S, et al. Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Current vascular pharmacology*, 2004, vol. 2, no 3, p. 281-299.

PENG, C, et al. Detection and photodynamic therapy of inflamed atherosclerotic plaques in the carotid artery of rabbits. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 2011, vol. 102, no 1, p. 26-31.

PEROTTI, C, et al. Porphyrin synthesis from ALA derivatives for photodynamic therapy. In vitro and in vivo studies. *British journal of cancer*, 2004, vol. 90, no 8, p. 1660.

PERUMAL, O, et al. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no 24-25, p. 3469-3476.

SAHAY, G, et al. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*, 2010, vol. 145, no 3, p. 182-195.

SEIB, FP, et al. Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *Journal of controlled release*, 2007, vol. 117, no 3, p. 291-300.

STAN, R. Endocytosis pathways in endothelium: how many?. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006, vol. 290, no 5, p. L806-L808.

XIAO, K, et al. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no 13, p. 3435-3446.

ZHU, X, et al. Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, p. jbc. M110. 145888.



DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

FS/pro-FS	RESULTADOS
Porfirinas	✓ Modelo tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Balb/C) LM3 ★ TAPP
Conjugados de ALA	✓ Modelo LCCT <i>in vitro</i> . Myla (MF) y Hut 78 (SS) ★ 1i, 1g y 1f
Derivados peptídicos de ALA	✓ Modelo no tumoral/ tumoral <i>in vitro</i> PAM212/PAM212-Ras ✓ Modelo tumoral <i>in vivo</i> (Balb/C) LM2 ★ Ac-Phe-ALA-Me
Dendrímeros de ALA	✓ Modelo tumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Balb/C) LM3 ✓ Modelo placa ateromatosa RAW 264.7 (macrófagos) y HMEC-1 (células endoteliales) ★ 6m-ALA

★ Compuestos más promisorios para cada modelo

Esquema 1: Resumen de resultados obtenidos

En el Esquema 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, a partir de los cuales se discuten y elaboran las siguientes conclusiones:

Dado que las porfirinas son los FS más empleados y efectivos, en esta tesis se utilizaron derivados meso sustituido de porfirinas, así como también pro-FS que, mediante un proceso de síntesis endógena, generan porfirinas tales como la PpIX, buscando encontrar la aplicación óptima para cada uno de ellos, razón por la cual fueron evaluados en diferentes modelos *in vitro* y eventualmente *in vivo*, de acuerdo a sus características químicas.

El primer enfoque involucró la búsqueda de nuevos FS basados en porfirinas, con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas, selectividad tumoral, aplicaciones y en conclusión su eficacia en la TFD. El segundo enfoque se basó en la TFD mediada por ALA, la cual produce los FS endógenamente; en este caso se buscó obtener nuevos derivados de ALA que resultaran mejores que la molécula parental o su mejor derivado de uso clínico, el Hexil-ALA, bajo la premisa de optimizar sus propiedades fisicoquímicas con el fin de mejorar la incorporación del compuesto a las células y contribuir a alcanzar la mayor producción de porfirinas a bajas concentraciones, poseer selectividad tumoral y también ampliar el campo de acción de la ALA-TFD.

Comenzando por el primer enfoque, una de las metas más atractivas de la investigación en TFD es la búsqueda de nuevos FS con un alto rendimiento de oxígeno singlete, mayor selectividad y una farmacocinética favorable para su administración. En relación a esto, dadas sus características, se optó por trabajar con FS cuyas moléculas tienen como base a las porfirinas. Se obtuvieron 5 compuestos meso fenil sustituidos, cargados positivamente o con capacidad de adquirir carga positiva a pH fisiológico, con el fin de interaccionar de mejor manera con las membranas biológicas. Los sustituyentes de los FS generan una simetría en el macrociclo en la mayoría de los compuestos, excepto la porfirina unida al fullereno.

In vitro, se demostró que todos los FS ingresaban a las células, pero en diferentes proporciones. Si bien se encontró una correlación directa entre la cantidad de porfirinas incorporadas intracelulares y la eficacia fotodinámica a un tiempo dado, no se encontró una correlación lineal entre la mayor cantidad porfirinas y un mayor fotodaño en función del tiempo. El compuesto más fotoactivo a todos los tiempos estudiados fue el TAPP, razón por la cual se decidió continuar los estudios con este FS.

La mejor performance del TAPP en relación a los otros FS puede deberse a una combinación de factores tales como el grado de simetría lograda con la configuración de sus sustituyentes y, en línea con esto último, poseer un grado de lipofilicidad más favorable y adquirir cargas transientes dependiendo del medio donde se encuentre.

Los ensayos de incorporación celular determinaron que TAPP ingresa principalmente por transporte activo pero que el transporte pasivo juega un rol relevante en el proceso, y que dicha porfirina se localiza preferentemente en el aparato de Golgi.

La porfirina con el fullereno TCP-C₆₀ fue la que menor fotoactividad demostró, y a su vez fue la única que a tiempos largos (24 h) demostró poseer mayor fotoactividad, respecto a los tiempos de incubación de 3 h, por lo cual se debe considerar que las reacciones fotoquímicas involucradas puedan tomar más tiempo en evidenciarse en fotodaño. La diada porfirina-fullereno es capaz de producir un estado de separación de cargas fotoinducible, pudiendo competir eficientemente por un proceso de fotoreacción tipo I o II, dependiendo del ambiente en el que se encuentre (Milanesio et al., 2005; Alvarez et al., 2006). Por su estructura y tamaño, es posible que este compuesto pueda resultar útil en células de alta capacidad fagocítica tales como algunas tumorales y macrófagos.

Con el fin de poder trasladar los resultados obtenidos *in vitro* a un escenario *in vivo* se decidió trabajar con el modelo de adenocarcinoma mamario murino LM3. Este modelo de implantación subcutánea de un adenocarcinoma mamario es de fácil implementación por su bajo costo y por tratarse de un modelo alogénico.

Los ensayos *in vivo* con TAPP tópica mostraron una muy alta retención en el sitio de aplicación, siendo esto corroborado a través de estudios de microscopía de fluorescencia, en los cuales se observó una retención epidérmica general sin difusión dérmica, pero con cierta penetración a los folículos pilosos y glándulas sebáceas. Por otro lado, en los estudios sistémicos se observó la presencia del FS en altas cantidades en tumor, pulmón e intestino, mostrando una selectividad alta por estos tejidos; en tanto que también se lo halló en menor concentración, en bazo, hígado, riñón, piel, PAT y sangre; a partir de las 24 h.

Los resultados obtenidos con TAPP lo posicionan como un FS promisorio para la TFD, reforzando el interés en la búsqueda de nuevos FS meso sustituidos con diversas propiedades fotofísicas, sirviendo de molde para ulteriores modificaciones en su esqueleto base. Los estudios de TAPP tópico resultan interesantes para su uso en tumores localizados en piel con poca infiltración dérmica y subdérmica, especialmente para neoplasias anexas de la piel. En tanto que la alta selectividad tumoral por vía sistémica la señala como una molécula promisorio para la TFD aplicada por vía endoscópica. Por otro lado, la utilización de esta vía mostró una alta selectividad por los órganos, pulmón e intestino, abriendo la ventana a la posibilidad de fototensibilizar tumores de estos órganos.

En relación al segundo enfoque de la tesis, la necesidad de desarrollar modificaciones en la molécula de ALA, se basa en alto carácter hidrofílico de la misma, lo que dificulta su entrada a través de membranas biológicas, así como también su gran dispersión sistémica, que disminuye en gran medida los parámetros de distribución y cinética *in vivo*. El ALA es un pro-FS, sustrato natural de la ruta biosintética del hemo y aún modificaciones sutiles en su estructura impiden su correcta metabolización a porfirinas; es por ello que todas las modificaciones realizadas sobre la molécula de ALA deben ser pensadas en función de su liberación dentro de la célula.

En esta tesis se probaron tres series de derivados de ALA, la primera basada en ésteres de ALA unidos a distintas N-fenilacetamida sustituidas (conjugados de ALA) y ésteres comerciales He-ALA y Me-ALA; la segunda basada en la unión peptídica del ALA con un α -aminoácido acetilado (leucina o fenilalanina), y la tercera orientada a estructuras poliméricas hiper-ramificadas de ALA. Para su

evaluación se usaron diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales, e *in vitro*, se emplearon modelos de adenocarcinoma mamario murino implantado heterotópicamente en la zona subcutánea.

La capacidad de síntesis de porfirinas a partir de los pro-FS derivados del ALA evaluados, es el parámetro que se utilizó para evaluar a los nuevos compuestos en relación al ALA. En este sentido, debido a que la síntesis de porfirinas llega a un máximo en las células, que no puede ser superado por su fina regulación metabólica, el parámetro a evaluar fue la concentración de derivado de ALA necesaria para lograr el plateau de porfirinas.

Los niveles de porfirinas para cada tipo celular, son inversamente proporcionales a las DL_{50} s, ya que, a mayor cantidad de porfirinas, menor dosis lumínica es necesaria para fotosensibilizar a las células; de ahí que la DL_{50} es también un parámetro propio de cada tipo celular. Es por ello que el segundo parámetro a evaluar fue la dosis de luz requerida para alcanzar el 50% de muerte celular (DL_{50}). Este valor se expresó en mJ/cm^2 , y resultó útil para comparar el efecto fotodinámico de distintos compuestos para una misma línea celular, ya que cada línea posee una sensibilidad diferente al fotodaño.

En cuanto a los niveles máximos de porfirinas alcanzados a concentraciones plateau de ALA y sus derivados, es de destacar que ésta es una característica propia de cada célula y de su actividad metabólica del camino del hemo que da origen a las porfirinas. Además de la capacidad de biosíntesis de porfirinas, existen resistencias intrínsecas a la TFD propias de cada célula, tales como la conferida por el oncogén Ras, la capacidad de absorción de la luz de cada tipo celular, y las defensas antioxidantes propias de cada estirpe celular.

En esta tesis podemos destacar que se analizaron varias líneas celulares, tales como la adherente de carcinoma mamario murino LM3, los queratinocitos normales Pam212 y los tumorales transfectados Pam212-Ras, las líneas no adherentes de LCCT Myla y Hut78, las endoteliales HMEC-1 y los macrófagos RAW 264.7. La línea macrofágica fue la que sintetizó mayores niveles de porfirinas, alcanzando un valor máximo de 160 ng porfirinas/ 10^5 células, mientras que los queratinocitos Pam212 fueron los que menores niveles alcanzaron, sintetizando alrededor de 5 y los transfectados con Ras, 7 ng porfirinas/ 10^5 células. El resto de las líneas empleadas mostraron valores máximos de entre 50 y 60 ng porfirinas/ 10^5 células. Para cada tipo celular, se emplearon dosis lumínicas apropiadas para lograr un nivel medio de fotosensibilización y poder efectuar comparaciones entre distintos pro-FS.

Los ésteres de ALA N-fenilacetamida sustituidos (conjugados de ALA), se evaluaron en un modelo de LCCT con células Myla (MF) y Hut78 (SS) y demostraron ser excelentes productores de porfirinas, con máximos niveles de síntesis a concentraciones plateau 12 veces inferiores al ALA para los mejores compuestos, y comparables con el derivado He-ALA. El ALA a esas concentraciones genera 3 veces menos porfirinas. Por otro lado, la eficacia en la TFD confirma su relación directa con el nivel de síntesis de porfirinas, y los compuestos más prometedores fueron el 1i, 1g y 1f. Los grupos sustituyentes empleados en la generación de estos derivados son hidrofóbicos, y todos los conjugados poseen logD mayores que el ALA, por lo cual son más lipofílicos que la molécula parental. Sin embargo, no se ha hallado una correlación directa entre la lipofilicidad creciente y la síntesis de porfirinas. El tipo de sustituyente, así como la posición en el grupo arilo podrían influir en la estabilidad, entrada y metabolización de los conjugados, siendo los sustituyentes *para*, y entre ellos, los que involucran halógenos, los más promisorios.

Estos estudios confirmaron la eficacia del uso de conjugados del ALA en células no adherentes de LCCT, los cuales ya habían sido empleados con éxito en líneas celulares adherentes, obteniéndose excelentes resultados, comparables a los hallados en la línea de adenocarcinoma mamario murino LM2 (Gola et al. (2016). Los LCCT son una patología cutánea que al día de la fecha no tiene cura, es progresión lenta, pero en estadíos avanzados tiene mortalidad elevada. Los ensayos realizados *in vitro* en células Myla y Hut78, permiten apreciar el grado de eficacia de la TFD sobre esta patología. Esto abre el camino al uso de la TFD a esta patología, así como también al potencial uso de los nuevos derivados de ALA en la misma. En el futuro, se proyecta generar un modelo *in vivo* de la patología así como también avanzar en estudios con explantes de muestras aisladas de pacientes.

Con respecto a los derivados peptídicos de ALA, éstos se sintetizan mediante una unión peptídica entre el ALA (un delta aminoácido) y un alfa aminoácido N-acetilado (leucina o fenilalanina). Debido a que la aminopeptidasa CD13/aminopeptidasa N es un importante blanco en la señalización de Ras (Bhagwat et al., 2003), se decidió testear estos pro-FS en un modelo *in vitro* que consiste en un par celular no tumoral/tumoral Pam212 y Pam212-Ras, donde la línea tumoral se había originado por la inserción del oncogén Ras.

Los derivados peptídicos Ac-Leu-ALA-Me y Ac-Phe-ALA-Me logran llegar a valores plateau de porfirinas empleando cantidades de 10 y 50 veces menores que ALA respectivamente; en ambas líneas empleadas. En cambio, el ALA en las mismas concentraciones, produce entre 2 y 3 veces menos cantidad de porfirinas.

Estos niveles son comparables a los reportados por Vallecorsa y Casas (2014) para la línea LM3 donde se obtuvo para estos derivados peptídicos una efectividad 40 veces mayor que la del ALA.

Además, la utilización del par no tumoral/tumoral de la línea PAM212, ha permitido observar que la línea tumoral genera una cantidad de porfirinas un 20% superior que la línea no tumoral, pero paradójicamente, la eficacia de la TFD resulta menor, necesitándose mayores dosis lumínicas para generar un daño comparable al de la línea parental. Nuestro grupo ha reportado previamente este comportamiento para el par de líneas celulares mamarias HB4a y HB4a-Ras (Rodríguez et al., 2007), lo que demuestra que la sobreexpresión del oncogén Ras confiere resistencia a la ALA-PDT, independientemente de la cantidad de porfirinas sintetizadas.

Los ensayos *in vivo* de administración tópica en un adenocarcinoma transplantado subcutáneamente, demostraron la retención de ambos derivados en la PAT, con penetración del Ac-Phe-ALA y no del Ac-Leu-ALA hacia el tumor adyacente. A partir de estudios de microscopía de fluorescencia en cortes de piel, se confirmó que el Ac-Phe-ALA-Me se acumulaba en la piel, preferentemente en folículos pilosos y glándulas sudoríparas, con una menor acumulación en la epidermis en comparación con el ALA.

A partir de los resultados de los estudios sistémicos se observó síntesis porfirínica con máximos entre 1 a 5 h luego de la administración de los derivados peptídicos, -cinética similar a la observada para ALA-, siendo la acumulación en intestino y riñón, particularmente elevada. En relación al tumor, el derivado Ac-Phe-ALA-Me generó un 20% más porfirinas que el derivado Ac-Leu-ALA-Me luego de su administración.

Las diferencias en la efectividad de los dos derivados peptídicos, puede analizarse desde el punto de vista de la lipofilicidad. Ambos derivados presentan LogD bajos, sin embargo, reflejan un carácter lipofílico inferior al del He-ALA. El carácter hidrofóbico del derivado sustituido con fenilalanina es 2 veces mayor que el del derivado sustituido con leucina. Esto podría ser una de las razones que justifiquen la mayor eficacia en la generación de porfirinas, tanto *in vitro* como *in vivo* del derivado fenilalanínico, así como también la mayor retención en el sitio de aplicación. Sin embargo, esto no puede afirmarse de manera contundente ya que la lipofilicidad del compuesto no es la única variable responsable de una mejor respuesta a la TFD, como pudo observarse en el análisis de los ésteres de ALA N-fenilacetamida sustituidos, en el cual el grado de lipofilicidad no mostró

una correlación directa con la respuesta a la TFD óptima en el modelo de LCCT. No obstante, esta comparación permite proyectar el modelaje de ajustes químicos adicionales al esqueleto de los pro-FS con el fin de aumentar aún más la eficacia de la TFD y potenciar la traslación al campo clínico.

Estos resultados son muy promisorios y aumentan la evidencia del éxito en la conjugación de ALA con aminoácidos para promover la síntesis endógena de FS y mejorar la efectividad de la ALA-TFD. La propiedad de retención cutánea hace al Ac-Phe-ALA-Me, especialmente atractivo para su aplicación en tumores superficiales o patologías preneoplásicas como la queratosis actínica. Dentro de las neoplasias malignas cutáneas, resultaría un blanco interesante en neoplasias anexas, debido a su alta concentración del derivado en folículo piloso y glándulas sebáceas.

La utilización de estructuras macromoleculares como los dendrímeros, resulta una estrategia muy atractiva a la hora de vehiculizar moléculas con carácter hidrofílico como el ALA. Los dendrímeros de ALA utilizados en esta tesis, fueron los derivados de primera generación contruidos empleando el método convergente de síntesis, conteniendo 6 y 9 residuos de ALA. Estas estructuras son voluminosas, con pesos moleculares de 1502 Da y 2215 Da respectivamente, en comparación con el ALA (131 Da) o al He-ALA (215,3 Da); lo que hace pensar que su interacción con la célula es muy diferente a los del resto de los derivados de ALA estudiados en esta tesis. En una primera aproximación, estos estudios se realizaron en el modelo biológico de la línea celular de adenocarcinoma mamario murino LM3 *in vitro* e *in vivo*. La síntesis de porfirinas, permite tener una primera impresión de esta interacción. Ambos derivados generaron excelentes niveles de porfirinas, siendo 4 veces mayores en comparación con el propio ALA, y utilizando concentraciones 10 veces menores. No se ha observado toxicidad en las condiciones evaluadas, en comparación con otros dendrímeros de ALA de la misma serie, como el que contiene 18 residuos de ALA (Battah et al., 2007). A concentraciones sub-plateau, ambos dendrímeros generaron 7 veces más muerte celular que el ALA. Estos resultados muestran una mayor eficacia que otros dendrímeros de la misma serie previamente evaluados (con 3 y 18 residuos de ALA), sugiriendo a existencia de un límite en el tamaño óptimo de la macromolécula. En relación a los estudios *in vivo*, de los resultados de la administración tópica de los mismos sobre un tumor LM3 transplantado subcutáneamente, se observó que los dendrímeros inducen elevadas cantidades de porfirinas en la PAT, mucho mayores que el propio ALA, mientras que en la piel distante contralateral a la aplicación, generan una baja síntesis. La relación PAT:

tumor de porfirinas, revela una gran retención en el sitio de aplicación, resultando este hecho positivo para la TFD en el tratamiento de tumores cutáneos.

El uso emergente de la TFD es la fotoangioplastia (FAP), la cual surgió como una alternativa a la tradicional angioplastia para el tratamiento de obstrucción de arterias, cuyo problema mayor es el riesgo de restenosis (reestrechamiento) de las arterias. Dos fenómenos vuelven a la FAP interesante: a) el alto contenido lipídico de la placa ateromatosa tiende a unir FS o pro-FS lipofílicos; b) la potencial captación de macromoléculas por los macrófagos del sistema retículoendotelial. Es por eso que en una segunda aproximación en el estudio de los dendrímeros de ALA y debido a su tamaño, se testearon los dendrímeros 6m-ALA y 9m-ALA, en modelos biológicos de componentes de la placa ateromatosa (RAW 264.7 como modelo de macrófagos, y HMEC-1, de células endoteliales). La síntesis de porfirinas siguió un perfil similar a los exhibidos en los modelos de la línea tumoral LM3, sin embargo, la línea macrofágica demostró ser mejor productora, y particularmente el derivado 6m-ALA resultó superior al derivado con 9 ALAs. Este hecho puede deberse a que los residuos de ALA de este último dendrímero podrían no ser completamente liberados. Al relacionar la síntesis de porfirinas en ambas líneas, se observó una selectividad por los macrófagos de más de 5 veces. Al aplicar la TFD, se observó una mayor efectividad por la línea RAW 264.7. Un aspecto interesante a destacar es que los macrófagos incorporan los dendrímeros en gran parte por un mecanismo de endocitosis dependiente de caveolas.

Teniendo en cuenta estos resultados, en un futuro se planea extender los estudios a un modelo de células de músculo liso de aorta, y de células espumosas, a fin de analizar la respuesta a la TFD en los distintos componentes celulares del ateroma, así como en co-cultivos que contengan estos distintos tipos celulares.

Se puede concluir que los dendrímeros del ALA son promisorios en la TFD del cáncer, siendo estructuras que vehiculizan y dosifican la liberación del ALA. Por otro lado, se ha demostrado su potencial utilización en el tratamiento emergente de FAP.

Como conclusión general, en esta tesis que se ha enfocado en la búsqueda de nuevos FS o pro-FS que mejoren la TFD, se encontraron compuestos promisorios basados en diferentes estrategias de modificación del ALA y en el diseño de porfirinas meso fenil sustituidas. Estos resultados sientan las bases racionales para la generación de nuevos compuestos, así como también para un reposicionamiento de la TFD en ciertas patologías, que hasta el momento no eran un blanco habitual. Estos estudios nos alientan a seguir enfocados en la mejora de la TFD,

entendiéndola como un tratamiento realmente efectivo contra el cáncer, con gran potencial no sólo como monoterapia, sino también como complemento a las terapias tradicionales, y a seguir extendiendo los usos de la TFD a otras patologías.

Referencias

ALVAREZ, G, et al. Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C60 dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2006, vol. 38, no 12, p. 2092-2101.

BATTAH, S, et al. Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Molecular cancer therapeutics*, 2007, vol. 6, no 3, p. 876-885.

BHAGWAT, S, et al. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*, 2003, vol. 101, no 5, p. 1818-1826.

FERNANDEZ-GUARINO, M, et al. Plaque-phase mycosis fungoides treated with photodynamic therapy: results from 12 patients. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 2010, vol. 101, no 9, p. 785-791.

FERNÁNDEZ-GUARINO, M, et al. Terapia fotodinámica en micosis fungoides. *Actas dermo-sifiliograficas*, 2013, vol. 104, no 5, p. 393-399.

GOLA, G, et al. Synthesis of chemically diverse esters of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy via the multicomponent Passerini reaction. *RSC Advances*, 2016, vol. 6, no 92, p. 89492-89498.

MILANESIO, E, et al. Porphyrin-fullerene C60 Dyads with High Ability to Form Photoinduced Charge-separated State as Novel Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology*, 2005, vol. 81, no 4, p. 891-897.

RODRIGUEZ, L, et al. Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2007, vol. 6, no 12, p. 1306-1310.

VALLECOSA P, CASAS A. *Usos de Derivados de ALA y Nanopartículas en el Tratamiento Fotodinámico del Cáncer*. En: AIN LUCIANA Informes Finales: Segunda Cohorte Becarios de Formación Inicial en Investigación en Cáncer (2012-2013). Buenos Aires: Instituto Nacional Cáncer (Msal). 2014.ISBN 978-987-45494-2-6.

